

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Forschungsgruppe Zelluläre Allergologie

**Immunmodulation durch IPSE/alpha-1,
ein exkretorisch-/sekretorisches Protein
aus *Schistosoma mansoni*-Eiern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Katrin Knuhr

Kiel, 2015

Referent: Prof. Dr. Holger Heine
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 11. Februar 2016
gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Meinen Eltern gewidmet,
in lieber Erinnerung an meinen Papa

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Hygiene-Hypothese | 1 |
| 1.2 Die therapeutische Wurminfektion | 2 |
| 1.2.1 Die Wurmtherapie in der Humanmedizin | 2 |
| 1.2.2 Wurminfektionen in Tiermodellen humaner Erkrankungen | 3 |
| 1.3 Der parasitische Wurm <i>Schistosoma mansoni</i> | 3 |
| 1.4 Parasit-Wirt-Interaktionen am Beispiel der Schistosomiasis . . . | 5 |
| 1.4.1 Die Immunantwort des Wirts auf eine Infektion mit <i>S. man-</i> <i>soni</i> | 5 |
| 1.4.2 Beeinflussung des Immunsystems des Wirts durch <i>S. man-</i> <i>soni</i> | 7 |
| 1.4.2.1 Immunmodulatorische Faktoren aus Schistoso- | 7 |
| men-Eiern | |
| 1.4.2.2 Basophile Granulozyten als Bindeglied zwischen | 8 |
| Parasit und Wirt | |
| 1.4.2.3 Die Immunmodulation durch IPSE/alpha-1 . . . | 9 |
| 1.5 Zielsetzung | 10 |
| 2 Material | 13 |
| 2.1 Geräte | 13 |
| 2.2 Chemikalien und Reagenzien | 14 |
| 2.3 Häufig verwendete Puffer und Nährmedien | 16 |
| 2.3.1 Arbeiten mit Zellen | 16 |
| 2.3.1.1 Elutriationspuffer zur Aufreinigung von Zellen . | 16 |
| 2.3.1.2 Kulturmedium | 16 |
| 2.3.2 ELISA | 16 |
| 2.3.2.1 Waschpuffer | 16 |
| 2.3.2.2 Antikörper-Bindpuffer für IL-1 β , IL-6, IL-10, | 16 |
| TNF | |
| 2.3.3 Durchflusszytometrie | 16 |
| 2.3.3.1 FACS-Puffer | 16 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.3.2 | Färbepuffer | 17 |
| 2.3.4 | Immunhistochemie | 17 |
| 2.3.4.1 | Citratpuffer | 17 |
| 2.3.4.2 | 10x PBS | 17 |
| 2.3.4.3 | PBS-Tween | 17 |
| 2.3.4.4 | Färbepuffer | 17 |
| 2.3.4.5 | Blockierungspuffer | 17 |
| 2.4 | Häufig verwendete Stimuli in der Zellkultur | 18 |
| 2.4.1 | Antikörper | 18 |
| 2.4.2 | Zytokine | 18 |
| 2.4.3 | Weitere Stimuli | 18 |
| 2.5 | ELISA-Systeme | 19 |
| 2.6 | Antikörper in der Durchflusszytometrie | 19 |
| 2.6.1 | Primärantikörper | 19 |
| 2.6.2 | Isotypkontrollen | 19 |
| 2.7 | Antikörper in der Immunhistochemie | 20 |
| 3 | Methoden | 21 |
| 3.1 | Aufreinigung humaner Basophiler aus peripherem Blut | 21 |
| 3.1.1 | Ficoll/Percoll-Dichtegradientenzentrifugation | 21 |
| 3.1.2 | Gegenstromelutriation | 22 |
| 3.1.3 | Bestimmung der Zellzahl | 23 |
| 3.1.4 | Negative Selektion via immunomagnetischer Partikel | 23 |
| 3.1.5 | Bestimmung der Zellzahl und Basophilenreinheit | 24 |
| 3.2 | Aufreinigung humaner PBMC und Monozyten aus peripherem Blut | 24 |
| 3.2.1 | Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation | 24 |
| 3.2.2 | Gegenstromelutriation (zur weiteren Aufreinigung der Monozyten) | 25 |
| 3.2.3 | Zellzahlbestimmung am Casy [®] | 25 |
| 3.2.4 | Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer | 26 |
| 3.2.5 | Bestimmung des Monozytenanteils in den PBMC | 26 |
| 3.3 | Zellkultur | 26 |
| 3.3.1 | Stimulationsansatz der basophilen Granulozyten | 26 |
| 3.3.2 | Kokultur von Monozyten/PBMC und Basophilen | 26 |
| 3.3.3 | Kultur von Monozyten | 27 |
| 3.4 | ELISA | 27 |
| 3.4.1 | IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF | 28 |
| 3.4.2 | IL-4 und IL-13 | 28 |
| 3.5 | Durchflusszytometrie | 28 |
| 3.6 | Histologische Untersuchungen | 29 |
| 3.6.1 | Organaufbereitung | 29 |
| 3.6.2 | Paraffinschnitte | 29 |
| 3.6.3 | Färbungen | 29 |
| 3.6.3.1 | Immunhistochemische Färbung von Basophilen | 29 |
| 3.6.3.2 | Immunhistochemische Färbung von IPSE/alpha-1 | 30 |
| 3.6.3.3 | Zytochemischer Nachweis von Mastzellen | 30 |
| 3.7 | Formeln | 31 |
| 3.7.1 | Zentrifugation | 31 |
| 3.7.2 | Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer | 31 |
| 3.8 | Statistik | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Basophile in Granulomen um <i>S. mansoni</i> -Eier in Darm und Leber infizierter Mäuse | 33 |
| 4.1.1 | Der Nachweis von basophilen Granulozyten im Granulom um <i>S. mansoni</i> -Eier | 34 |
| 4.1.2 | Der Nachweis von Basophilen und IPSE/alpha-1 im Granulom um <i>S. mansoni</i> -Eier | 34 |
| 4.1.3 | Die Lokalisation von Mastzellen in Mausgeweben | 36 |
| 4.2 | Der Einfluss von TLR-4 Agonisten auf die durch IPSE/alpha-1 induzierte IL-4 Freisetzung aus Basophilen | 37 |
| 4.2.1 | LPS | 38 |
| 4.2.2 | HMG-1 | 38 |
| 4.3 | Mechanismus der durch IPSE/alpha-1 über Basophile vermittelten Antiinflammation | 39 |
| 4.3.1 | Das notwendige Verhältnis von Basophilen zu Monozyten bei der Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Monozyten, vermittelt durch IPSE/alpha-1 <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.3.2 | Die Rolle von basophilem IL-13 in der Inhibierung der Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten <i>in vitro</i> | 42 |
| 4.3.3 | Vergleich der biologischen Aktivität von natürlichem und rekombinantem IPSE/alpha-1 in der Kokultur | 43 |
| 4.3.4 | Der gegenseitige Einfluss von Monozyten und Basophilen in der Kokultur | 45 |
| 4.3.4.1 | Die Morphologie von Basophilen und Monozyten in der Kokultur | 45 |
| 4.3.4.2 | Das Migrationsverhalten Basophiler <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.3.4.3 | IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile hemmen zellkontaktunabhängig die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung aus Monozyten <i>in vitro</i> | 52 |
| 4.3.5 | Die Ausschüttung von IL-10 in der Kokultur | 52 |
| 4.4 | Die Entwicklung eines für M2-Makrophagen spezifischen Phänotyps durch Monozyten in Gegenwart von IL-4 | 56 |
| 4.5 | Auch die LPS-induzierte proinflammatorische Zytokinfreisetzung aus PBMC wird in Gegenwart IPSE/alpha-1-stimulierter Basophiler gehemmt | 58 |
| 5 | Diskussion | 61 |
| 5.1 | Die Bedeutung von basophilen Granulozyten im Granulom um <i>S. mansoni</i> -Eier | 61 |
| 5.1.1 | Basophile werden in das Granulom rekrutiert | 62 |
| 5.1.2 | Mastzellen werden nicht in das Granulom rekrutiert | 62 |
| 5.1.3 | Der Stimulus für die Rekrutierung Basophiler in das Granulom ist unbekannt | 63 |
| 5.1.4 | Die Interaktion von Basophilen und IPSE/alpha-1 im Granulom | 64 |
| 5.2 | Die Aktivierung von Basophilen | 65 |
| 5.2.1 | Die kombinierte Stimulation von TLR und FcεRI führt zu einer synergistischen Erhöhung der Zytokinfreisetzung aus Basophilen | 65 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 5.3 | Die Bedeutung von basophilem IL-4 bei der Immunregulation von Entzündungen | 66 |
| 5.3.1 | Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wird durch die IPSE/alpha-1-induzierte Aktivierung von Basophilen gehemmt | 66 |
| 5.3.2 | Monozyten entwickeln sich in Gegenwart von IL-4 zu M2-Makrophagen | 68 |
| 5.3.3 | Die Rolle der von Basophilen sezernierten Zytokine in der durch IPSE/alpha-1 vermittelten antiinflammatorischen Reaktion | 69 |
| 5.4 | Die IPSE/alpha-1 vermittelte Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung erfolgt zellkontaktunabhängig | 70 |
| 5.5 | Ausblick | 71 |
| | Literatur | 72 |
| | Anhang | 85 |
| | A Die normalisierte, individuelle Ausschüttung von IL-10 aus Monozyten in der Kokultur | 86 |
| | B Die individuelle Ausschüttung von IL-4 aus Basophilen in der Kokultur | 87 |
| | Zusammenfassung | 88 |
| | Abstract | 90 |
| | Danksagung | 91 |
| | Erklärung | 93 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Der Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i> | 4 |
| 1.2 | Die Immunantwort auf eine Infektion mit <i>S. mansoni</i> | 6 |
| 1.3 | Die Hemmung der LPS-induzierten IL-1 β und IL-6 Freisetzung aus humanen Monozyten in Kokultur mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen | 10 |
| 1.4 | Die schematische Darstellung der Hemmung der LPS-induzierten IL-1 β und IL-6 Freisetzung aus humanen Monozyten in Kokultur mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen | 11 |
| 3.1 | Die schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll/Percoll-Gradienten | 22 |
| 3.2 | Das Prinzip der Elutriation | 23 |
| 4.1 | Der immunhistologische Nachweis von Basophilen im <i>S. mansoni</i> -Eigranulom in Leber- und Darmgewebe von Mäusen | 35 |
| 4.2 | Der immunhistologische Nachweis von IPSE/alpha-1 und Basophilen im <i>S. mansoni</i> -Eigranulom in Leber- und Darmgewebe von Mäusen | 36 |
| 4.3 | Der Nachweis von Mastzellen in Leber- und Darmgewebe von mit <i>S. mansoni</i> infizierten und gesunden Mäusen | 37 |
| 4.4 | Die Freisetzung von IL-4 aus humanen Basophilen nach Stimulation mit <i>E. coli</i> -IPSE/alpha-1 in An- und Abwesenheit von LPS und HMG-1 | 39 |
| 4.5 | Die IL-4 Freisetzung aus humanen Basophilen in der Kokultur bei verschiedenen Zellkonzentrationen | 40 |
| 4.6 | Das notwendige Verhältnis der Basophilen- zur Monozytenzahl für die durch IPSE/alpha-1-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus humanen Monozyten <i>in vitro</i> | 41 |
| 4.7 | Die Aufhebung der Wirkung von rekombinantem IL-13 auf die Zytokinfreisetzung aus humanen Monozyten | 43 |
| 4.8 | Der Einfluss von IL-4 und IL-13 aus Basophilen auf die IL-6 Freisetzung aus LPS-stimulierten humanen Monozyten in der Kokultur | 44 |
| 4.9 | Der Vergleich der biologischen Aktivität verschiedener IPSE-Präparationen in der Kokultur | 45 |
| 4.10 | Die Morphologie unstimulierter und stimulierter humaner Basophiler in der Zellkultur | 46 |
| 4.11 | Die Morphologie humaner Basophiler in der Kokultur mit Monozyten | 47 |
| 4.12 | Die Permeabilität von Transmembran-Einsätzen mit unterschiedlicher Porengröße in der Zellkultur | 48 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.13 | Die Permeabilität von Transmembran-Einsätzen mit unterschiedlicher Porengröße in der Kokultur | 50 |
| 4.14 | Das Migrationsverhalten humaner Basophiler <i>in vitro</i> durch Poren in Gegenwart verschiedener Chemoattraktoren | 51 |
| 4.15 | Die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus humanen Monozyten durch Basophilen-Überstand | 53 |
| 4.16 | Die IL-10 Freisetzung aus stimulierten humanen Monozyten nach verschiedenen Stimuli in Ab- und Anwesenheit von Basophilen . . | 54 |
| 4.17 | Die IL-10 Freisetzung aus stimulierten humanen Monozyten nach Applikation von Basophilen-Überstand | 55 |
| 4.18 | Der Einfluss von rekombinantem humanen IL-4 auf die Expression von CD14, CD206 und CD209 humaner Monozyten <i>in vitro</i> . . | 57 |
| 4.19 | Der Einfluss von basophilem IL-4 auf die Expression von CD14, CD206 und CD209 humaner Monozyten in der Kokultur | 58 |
| 4.20 | Der Einfluss IPSE/alpha-1-stimulierter Basophiler auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung in der Kokultur mit humanen PBMC | 59 |
| 5.1 | Der Mechanismus der durch IPSE/alpha-1 vermittelten Entzündungskontrolle | 71 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.3 | Liste der in der Zellkultur verwendeten Antikörper | 18 |
| 2.4 | Liste der in der Zellkultur verwendeten rekombinanten Zytokine | 18 |
| 2.5 | Liste weiterer in der Zellkultur verwendeter Stimulantien | 18 |
| 2.6 | Liste der verwendeten ELISA-Systeme | 19 |
| 2.7 | Liste der verwendeten Antikörper für FACS-Analysen | 19 |
| 2.8 | Liste der verwendeten Isotypkontrollen für FACS-Analysen | 19 |
| 2.9 | Liste der verwendeten Antikörper in der Immunhistochemie | 20 |
| 3.1 | Elutriationsprotokoll für Basophile Granulozyten | 22 |
| 3.2 | Elutriationsprotokoll für Monozyten | 25 |
| A.1 | Die normalisierte, individuelle Ausschüttung von IL-10 aus Monozyten in der Kokultur | 86 |
| B.1 | Die individuelle Ausschüttung von IL-4 aus Basophilen in der Kokultur | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

Neben den SI-Einheiten und den daraus abgeleiteten Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|------------------|---|
| A | Austria (lateinisch für Österreich) |
| AAM | alternatively activated macrophages (englisch) |
| abs. | absolut |
| AF | Alexa Fluor |
| APC | Allophycocyanin |
| B | Belgien |
| BSA | bovine serum albumin (englisch) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CAM | classically activated makrophages (englisch) |
| CD | cluster of differentiation (englisch) |
| CD4 ⁺ | CD4-positiv |
| CD8 ⁺ | CD8-positiv |
| CH | Confoederatio Helvetica (lateinisch für Schweiz) |
| CLR | C-type lectin receptor (englisch) |
| D | Deutschland |
| DAPI | 4',6'-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | dendritic cell(s) (englisch) |
| DC-SIGN | dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing non-integrin (englisch) |
| d. h. | das heißt |
| DNS | Desoxiribonukleinsäure |
| EAE | experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay (englisch) |
| F | Frankreich |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting (englisch) |
| Fc | fragment crystalline (französisch) |
| FcεRI | Fcε-Rezeptor Typ I |
| FCS | fetal calf serum (englisch) |
| FG | Forschungsgruppe |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | forward scatter (englisch) |
| FZB | Forschungszentrum Borstel |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |

| | |
|----------------------------------|--|
| h | human |
| HBSS | Hanks balanced salt solution (englisch) |
| HEK | human embryonic kidney (englisch) |
| hi | hitzeinaktiviert |
| His | Histidin |
| HMG-1 | High-mobility group protein B1 (englisch) |
| HRP | Horseradish peroxidase (englisch) |
| HS | Humanserum |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells (englisch) |
| ICAM | intracellular adhesion molecule (englisch) |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-4R α | Interleukin-4-Rezeptor α -Kette |
| IMDM | Iscoe's modified Dulbecco's medium (englisch) |
| IPSE | IL-4 induzierendes Prinzip aus <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiern |
| IRL | Irland |
| J | Japan |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| m | mouse (englisch) |
| M. Crohn | Morbus Crohn |
| M1 | Makrophagen Typ 1 |
| M2 | Makrophagen Typ 2 |
| MACS | magnetic-activated cell sorting (englisch) |
| MCP8 | mast cell protease 8 (englisch) |
| MHC | major histocompatibility complex (englisch) |
| MS | Multiple Sklerose |
| n | natürlich |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| Na ₂ HPO ₄ | Di-Natriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid / Natronlauge |
| <i>N. americanus</i> | <i>Necator americanus</i> |
| n. d. | nicht detektierbar |
| NK | natural killer (englisch) |
| NOD | non-obese diabetic (englisch) |
| Nr. | Nummer |
| o. g. | oben genannt |
| p. a. | pro analysi |
| PAF | plättchenaktivierender Faktor |
| PAMPs | pathogen-associated molecular patterns (englisch) |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cell(s) (englisch) |
| PBS | phosphate-buffered saline (englisch) |
| PE | Phycoerythrin |
| S | Schweden |
| Sav | Streptavidin |
| SI | Système international d'unités (französisch) |

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| <i>S. mansoni</i> | <i>Schistosoma mansoni</i> |
| SmEA | <i>Schistosoma mansoni</i> Ei-Antigen |
| s. o. | siehe oben |
| SSC | side scatter (englisch) |
| s. u. | siehe unten |
| Th | T-Helfer |
| Th1 | T-Helfer Typ 1 |
| Th2 | T-Helfer Typ 2 |
| Th17 | T-Helfer Typ 17 |
| TLR | toll-like receptor (englisch) |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNBS | 2,4,6-Trinitrobenzosulfonsäure |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| <i>T. suis</i> | <i>Trichuris suis</i> |
| u. | und |
| u. a. | und andere(s) / unter anderem |
| u. g. | unten genannt |
| UK | United Kingdom (englisch) |
| ÜS | Überstand |
| USA | United States of America (englisch) |
| v/v | volume per volume (englisch) |
| WHO | World Health Organization (englisch) |
| w/v | weight per volume (englisch) |
| z. B. | zum Beispiel |

Kapitel 1

Einleitung

Weltweit sind nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) über zwei Milliarden Menschen mit parasitisch lebenden Würmern, sogenannten Helminthen, infiziert. Während bis heute die Inzidenz von Wurminfektionen in den Entwicklungsländern aufgrund der dortigen klimatischen und hygienischen Bedingungen sehr hoch ist, ist sie in den Industriestaaten in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts stark gesunken. Gleichzeitig steigt mit dem Rückgang an Helmintheninfektionen in den Industriestaaten hier jedoch die Prävalenz für Allergien, Asthma und Autoimmunerkrankungen (s. u.). Dabei scheint das Vorkommen von Würmern reziprok mit dem Auftreten von entzündlichen Erkrankungen zu korrelieren.

Tatsächlich entstand der den entzündlichen Erkrankungen zugrunde liegende Mechanismus während der Entwicklung des Immunsystems des Wirts ursprünglich, um Parasiten aus diesem zu entfernen [29, 59]. Parallel dazu haben die Parasiten Mechanismen kreiert, die die Immunreaktion des Wirts abschwächen [152]. Hierbei scheint es, dass die Modulation der angeborenen Immunantwort des Wirts eine Fehlleitung der erworbenen Immunität verhindern kann [145]. U. a. deswegen sind Helminthen, beispielsweise der Pärchenegel *Schistosoma mansoni*, interessante Forschungsobjekte. In der chronischen Spätphase der Infektion mit Helminthen wird eine Th2-Immunantwort durch hochaktive entzündungshemmende Moleküle unterdrückt. Solche Moleküle könnten bei der Kontrolle entzündlicher Th2-assoziiierter Erkrankungen wie Allergien und Asthma von prophylaktischem und therapeutischem Nutzen sein.

1.1 Die Hygiene-Hypothese

Die Inzidenz für atopische Erkrankungen, wie Neurodermitis, allergische Rhinitis und Asthma, sowie für Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose (MS), Morbus Crohn (M. Crohn) und Typ-1-Diabetes, ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen [6, 40, 104]. Gleichzeitig konnte infolge verbesserter Hygiene- und Impfstrategien ein Rückgang vieler Infektionskrankheiten wie Mumps, Masern und Tuberkulose verzeichnet werden [10]. Diese und weitere Befunde führten zu der erstmals 1989 von Strachan et al. beschriebenen „Hygiene-Hypothese“. Sie besagt, dass die Zunahme atopischer Erkrankungen mit der zunehmenden Hygiene und der geringeren Anzahl an Infektionen im Kindesal-

ter korreliert [123]. Tatsächlich ist die Prävalenz für das Auftreten von allergischen Erkrankungen in den Entwicklungsländern deutlich geringer als in den Industriestaaten [12]. Gestützt wird diese These durch eine Reihe von Studien, die zeigen, dass virale, bakterielle und parasitäre Infektionen einen protektiven Effekt auf die Allergieentwicklung haben [3, 26, 38, 95, 146, 148].

1.2 Die therapeutische Wurminfektion

Der Grundgedanke der „Hygiene-Hypothese“ ist also, dass einige infektiöse Stimuli – insbesondere jene, die sich zusammen mit dem Menschen in einer Koevolution entwickelt haben – einen Schutz gegen ein breites Spektrum immunassoziierter Erkrankungen bieten. So hat, dieser durch epidemiologische Daten gestützten These zufolge, die Eliminierung von u. a. Helminthen aus unserer Umwelt und damit ihres immensen Einflusses auf das menschliche Immunsystem mit zu der erhöhten Prävalenz von Allergien und Autoimmunerkrankungen beigetragen [3, 89, 145].

Das Wissen um diese Zusammenhänge wird in der Wurmtherapie zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen genutzt. Diese Form der Immuntherapie beruht darauf, dass durch die willentliche Infektion des Patienten mit Helminthen dessen systemische Immunreaktion so moduliert wird, dass Entzündungsprozesse abgeschwächt werden.

1.2.1 Die Wurmtherapie in der Humanmedizin

Derzeit werden eine Reihe klinischer Studien zur Therapie diverser entzündlicher Erkrankungen mittels Helmintheninfektion durchgeführt. Weltweit sind bereits zwei intestinale Parasiten bzw. deren Eier im klinischen Einsatz:

- Eier von *Trichuris suis* – Schweinepeitschenwurm-Eier [31]
- *Necator americanus* – Hakenwurm, humanpathogen [103]

Das deutsche Unternehmen Ovamed GmbH in Barsbüttel bei Hamburg vertreibt die Eier von *T. suis* zur Behandlung von M. Crohn und Colitis Ulcerosa. Die kontrollierte Gabe dieser Eier alle drei Wochen über sechs Monate hinweg konnte bei 21 von 29 Patienten mit M. Crohn die Symptomatik der Erkrankung ohne Nebenwirkungen verbessern [125]. Auch Patienten mit Colitis Ulcerosa wurden die Eier von *T. suis* verabreicht. Eine signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes war hier bei 13 von 30 Studienteilnehmern zu beobachten gegenüber 4 von 24 bei Gabe eines Placebos [126].

Desweiteren wurden Patienten mit M. Crohn subkutan mit den infektiösen Larven von *N. americanus* geimpft. Hier wurde eine leichte Verbesserung der Symptome beobachtet, jedoch kehrten diese bei reduzierter Gabe der zur Therapie der Erkrankung verabreichten, immunsuppressiven Medikamente zurück [21].

Auch wenn die Therapie entzündlicher Erkrankungen mit intakten Helminthen vielversprechend erscheint, birgt sie Risiken, wie eine mögliche Organschädigung durch Invasion der Würmer aus dem Darm und eine eventuell veränderte Immunität gegenüber anderen Krankheitserregern. Bei der Verabreichung von Eiern besteht zusätzlich die Gefahr der Kontamination mit Fremd-Antigenen: Zwar werden die Wurmeier aus *in vitro*-kultivierten trächtigen Wurmweibchen

gewonnen und hygienisch aufgearbeitet, die Würmer jedoch reifen in Därmen ausschließlich für ihre Anzucht gehaltener Schweine heran. In jedem Fall stellt diese Form der Therapie eine große Herausforderung und auch Überwindung für den Patienten dar. Ferner konnten aktuelle Studienergebnisse einer 2010 begonnenen Phase-II-Studie (intern doppelblind, randomisiert, placebokontrolliert und multizentrisch) zur Untersuchung der Wirksamkeit und Sicherheit oral einzunehmender Ei-Suspensionen von *T. suis* bei aktivem M. Crohn die hohen Erwartungen an die Wurmtherapie nicht bestätigen. Nicht nur bei den mit *T. suis*-Eiern behandelten Probanden, sondern auch in der Placebogruppe konnte eine signifikante Verbesserung des Krankheitszustandes verzeichnet werden [117]. So bedarf es weiterer Untersuchungen, um spezifische, immunregulatorische Wurmkomponenten zu charakterisieren und daraus neue, nebenwirkungsarme Therapeutika zu entwickeln. Einen vielversprechenden Ausgangspunkt hierfür bietet die umfassend untersuchte Infektion mit dem parasitischen Helminthen *Schistosoma mansoni* [97].

1.2.2 Wurminfektionen in Tiermodellen humaner Erkrankungen

Es existieren bereits eine Vielzahl tierexperimenteller Daten, die die Modulation entzündlicher Erkrankungen, wie z. B. Typ-1-Diabetes, rheumatoide Arthritis, allergisches Asthma, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Adipositas, durch verschiedene Helminthen beschreiben [67].

Es ist belegt, dass die Infektion mit *S. mansoni* bzw. die Immunisierung mit *S. mansoni*-Eiern oder Eiextrakten (SmEA) Non-obese diabetic (NOD)-Mäuse vor der Ausbildung eines Typ-1-Diabetes bewahrt [19, 151] und die Schwere der Kollagen-induzierten Arthritis mindert [91]. Ebenso schützt eine Schistosomeninfektion Mäuse vor der Entwicklung von allergischen Atemwegserkrankungen [77, 92, 122]. Ferner kann so auch das Fortschreiten der Experimentellen Autoimmun Enzephalomyelitis (EAE) – einer der humanen MS ähnlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems [70, 119, 153] sowie 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure-(TNBS)-induzierter Kolitis in Mäusen [31, 106] verhindert werden.

1.3 Der parasitische Wurm *Schistosoma mansoni*

Für den Menschen kann eine Wurminfektion auch letal enden: 300.000 der nach Schätzungen der WHO weltweit 200 Millionen Menschen, die chronisch mit *S. mansoni* infiziert sind [55], sterben jährlich an den Folgen der Schistosomeninfektion [54, 110].

Die Pärchenegel (*Schistosoma*), die vor allem in den Tropen und Subtropen vorkommen, sind eine Gattung parasitisch lebender Saugwürmer (Trematoden). Die Infektion mit *S. mansoni* erfolgt in kontaminiertem Süßwasser über Zerkarien, die aktiv über die Haut in den Wirt eindringen. Dabei verlieren die Zerkarien ihren Schwanz und wandeln sich in Schistosomula um. Diese wandern für Stunden bis Tage durch das kutane Gewebe, bis sie Anschluss an das Blutgefäßsystem finden und mit dem Blutstrom durch den Körper in die Leber gespült werden. In der Pfortader reifen sie zu adulten Würmern heran und bilden Paare. Ausgelöst durch die Paarbildung, bei der sich das Weibchen in die

Bauchfalte des Männchens legt, erreichen die Würmer ihre Geschlechtsreife und wandern aktiv gegen den Blutstrom in die Mesenterialvenen ein. Dort produziert jedes Pärchen über Jahre und sogar Jahrzehnte täglich bis zu 300 Eier. Die Eier durchqueren das Gefäßendothel und die Basalmembran der Vene und bewegen sich dann durch das umliegende Gewebe, um schließlich auch die Basalmembran und das Epithel des Darms zu passieren und so in das Darmlumen zu gelangen. Etwa zwei Monate nach der Infektion können erste *S. mansoni*-Eier in den Fäzes nachgewiesen werden.

Insgesamt penetrieren jedoch nur etwa 50 % der Eier erfolgreich die Darmwand. Die andere Hälfte wird mit dem Blutstrom weggespült und gelangt in verschiedene Organe, vor allem die Leber, aber auch in den Darm, wo sich Granulome bilden. Fibrotische Prozesse führen zum Krankheitsbild der Bilharziose mit Leberfibrose, Hepatosplenomegalie und Aszitis. In seltenen Fällen treten weitere Komplikationen durch Wurmeier auf, die in das Gehirn, die Leber oder die Nieren gespült werden.

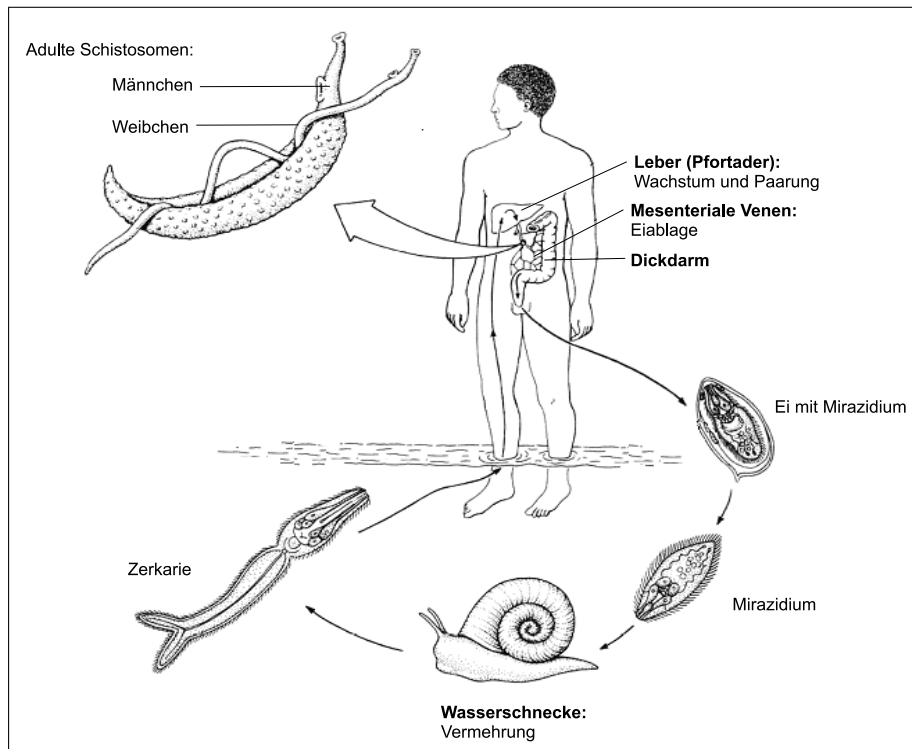


Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *S. mansoni*, modifiziert nach [107]

Gelangen die mit den Fäzes ausgeschiedenen Eier in Binnengewässer, schlüpfen – ausgelöst durch den niedrigen osmotischen Druck und Licht – die in den Eiern enthaltenen Wimpernlarven (Mirazidien). Die Mirazidien dringen innerhalb weniger Stunden aktiv in ihren ersten Zwischenwirt, eine Wasserschnecke der Gattung *Biomphalaria*, ein. Dort entwickeln sie sich zu sogenannten Muttersporozysten, die wiederum Tochtorsporozysten bilden. Aus diesen gehen schließlich die charakteristischen Gabelschwanzzerkarien hervor, welche die Schnecke ver-

lassen. Im Wasser bewegen sich die Zerkarien auf der Suche nach ihrem Endwirt, dem Menschen, zielgerichtet Licht und Wärme entgegen [97].

1.4 Parasit-Wirt-Interaktionen am Beispiel der Schistosomiasis

Bereits anhand des ausgeklügelten Lebenszyklus von *S. mansoni* wird deutlich, dass Schistosomen raffinierte Strategien zur Manipulation des Immunsystems ihres Wirts entwickelt haben müssen. Dieser benötigt seinerseits ebenfalls Abwehr- und Kontrollmechanismen gegen den Parasiten, um überleben zu können. Wechselseitige Regulationsprozesse, die aus einer langen Koevolution der Helminthen und ihrer Wirte hervorgegangen sind, ermöglichen nun das Überleben beider. Dabei haben Helminthen während der Evolution einen hohen Selektionsdruck auf das Genom des menschlichen Immunsystems ausgeübt [11, 39]. Für den Wirt vorteilhafte Mutationen, die seine Widerstandskraft gegenüber Pathogenen erhöhen, wurden positiv selektioniert, während solche Gene, die ihn anfällig für Infektionen machten, negativ selektioniert und aus dem Genpool entfernt wurden [11, 72]. Schließlich geht so eine unbehandelte Infektion mit *S. mansoni* nach Wochen in ein chronisches Stadium über und kann jahrzehntelang fortbestehen. Symptome treten, wie bereits geschildert, vor allem an Orten auf, an denen die Eier des Parasiten zu liegen kommen, also vor allem in der Leber, aber auch in dem Darm. Dabei ist ihre Schwere abhängig vom Ausmaß des Parasitenbefalls.

1.4.1 Die Immunantwort des Wirts auf eine Infektion mit *S. mansoni*

Für das Immunsystem des Wirts stellt die Infektion mit *S. mansoni* eine große Herausforderung dar. Es ist nicht nur mit einem vielzelligen Pathogen konfrontiert, sondern zusätzlich mit verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten: Zerkarien, Schistosomula, adulten Würmern und Wurmeiern.

Dementsprechend ist, wie in Abbildung 1.2 auf Seite 6 dargestellt, die komplexe Immunreaktion des Wirts auf eine Infektion mit *S. mansoni* durch drei immunologische Phasen charakterisiert:

- Th1-Immunantwort
- Th2-Immunantwort
- modulierte Th2-Immunantwort

Auf eine initiale Th1-Immunantwort in den ersten Wochen nach dem Eindringen der Zerkarien und während der Wanderung der Schistosomula folgt eine ausgeprägte Th2-Immunantwort als Reaktion auf den Beginn der Freisetzung der immunologisch relevanten Wurmeier in das Gewebe. Charakteristika für diese Th2-Antwort, die essentiell für die Prävention eines letalen Infektionsverlaufs ist [96], sind eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut, begleitet von hohen Titern an Immunglobulin E (IgE) und der Interleukine (IL) IL-4 und IL-13. Diese beiden Th2-assoziierten Zytokine wirken auf die Schleimhautzellen der Darmwand ein und erhöhen deren Mukosasekretion und Peristaltik.

Gleichzeitig degranulieren Mastzellen IgE-vermittelt und setzen aus ihren Granula Mediatoren, z. B. IL-4, IL-13, Histamin und Leukotriene, frei, so dass die Wirkung der Th2-Zellen verstärkt wird [75].

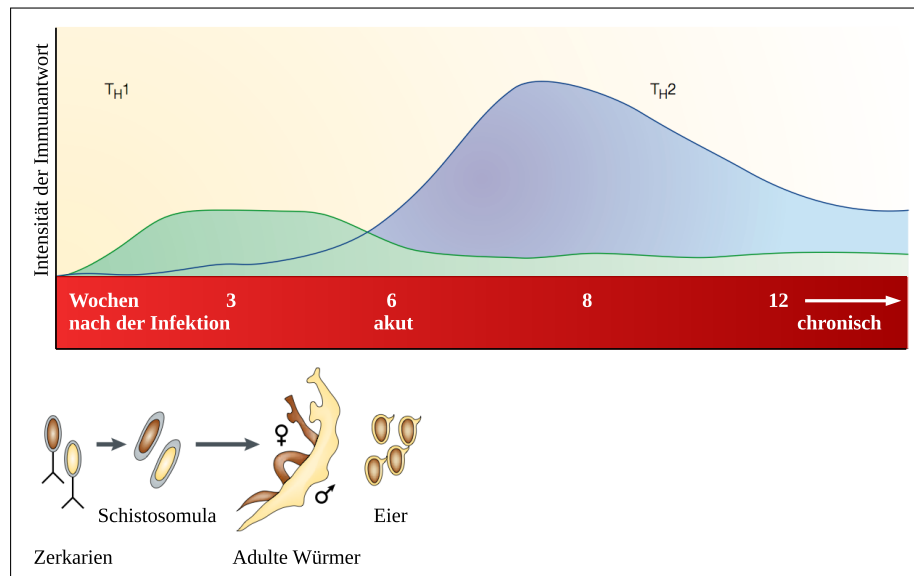


Abbildung 1.2: Immunantwort auf eine Infektion mit *S. mansoni*, modifiziert nach [97]

Ab der zwölften Woche nach der Infektion wird auch diese Immunantwort durch antiinflammatorische Mechanismen supprimiert. Es kommt hierbei zu einer regulatorischen T-Zellantwort. Auch alternativ aktivierte Makrophagen (AAM) sind an dieser Reaktion beteiligt. Ferner werden die Zytokine IL-5 und IL-13 unterdrückt sowie die Zytokine IL-10 und TGF- β vermehrt sezerniert [32, 53, 97, 101, 110]. Ausgelöst werden die immunmodulatorischen Prozesse durch eine Interaktion zwischen sowohl den lebenden Helminthen als auch deren Antigenen und Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLR), stark exprimiert auf dendritischen Zellen und Makrophagen des Wirts [25, 131, 152]. Letztendlich kann sich so die Wurmerkrankung chronisch etablieren.

Auch wenn die Th2-Immunantwort des Wirts nicht ausreicht, um sich des gewebständigen Parasiten zu entledigen, scheint sie dennoch essentiell für das Überleben des Wirts zu sein: So sterben *S. mansoni*-infizierte IL-4-defiziente Mäuse infolge einer mangelnden Th2-Antwort früh an intestinalen Entzündungen [16]. Ebenso zeigen IL-4 Rezeptor- α -defiziente Mäuse, die mit *S. mansoni* infiziert sind, eine exzessive Entzündung ihres Darms mit einer Mortalität von 100 % [51, 52].

Für die Pathogenese der Schistosomiasis sind die Schistosomen-Eier am bedeutendsten. Einerseits schädigen die aus den Gefäßen austretenden Eier das Wirtsgewebe. Andererseits induzieren in der Eihülle gebildete Faktoren gleichermaßen wie von den Mirazidien durch die Eihülle sezernierte Produkte eine starke Immunantwort und lösen so komplexe Entzündungsreaktionen aus, die zur Granulombildung um das Ei führen [7]. Bereits in den 70er Jahren wurde begonnen, die am granulomatösen Entzündungsgeschehen um *S. mansoni*-Eier beteiligten

Immunzellen zu charakterisieren [83]. In den Granulomen wurden kleine und große mononukleäre Zellen gefunden. Die kleinen mononukleären Zellen sind nahezu ausschließlich Lymphozyten, während die Population der großen mononukleären Zellen sich aus Makrophagen, epithelioiden Zellen und Fibroblasten zusammensetzt. Ferner wandern eosinophile und neutrophile Granulozyten in das Granulom ein [35, 36, 60, 71, 83]. Plasmazellen und Mastzellen finden selten [78, 129, 144], basophile mononukleäre Zellen erst jüngst Erwähnung [4]. Je nach Alter der Granulome variieren die prozentualen Anteile der Immunzellen: Zu Beginn der Granulombildung überwiegen Lymphozyten; CD4⁺-T-Zellen sind primär an der Immunantwort gegen *S. mansoni*-Eier beteiligt [36, 60]. Später dominieren Eosinophile mit bis zu 70 % aller Zellen [83]. AAM sind schließlich an der Fibrosebildung beteiligt. Induziert durch die Zytokine IL-4 und IL-13 exprimieren sie Arginase und stellen damit letztendlich Prolin für die Kollagensynthese in Fibroblasten zur Verfügung [35, 101]. Die sich so um die Eier von *S. mansoni* bildenden Granulome sind von großer Bedeutung beim Schutz der Gewebe vor toxischen Eiprodukten [4, 139].

1.4.2 Beeinflussung des Immunsystems des Wirts durch *S. mansoni*

In Jahrmillionen der Koevolution mit ihrem Wirt konnten Schistosomen effektive Strategien entwickeln, dessen Immunantwort zu entgehen [152]. Sie bauen Wirtsantigene in ihr Tegument – ihre sekundäre Körperbedeckung – ein, spalten enzymatisch Antikörper und ändern schnell ihre Oberflächenmembran durch vorgeformte Membranvesikel [22, 98]. Desweiteren produzieren und sezernieren sie immunmodulatorische Moleküle, die über Rezeptoren auf den Wirtszellen, in erster Linie regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, die Immunreaktion des Wirts beeinflussen [145].

Von besonderer Bedeutung in der Immunmodulation der Wirtsabwehr sind, wie bereits oben erwähnt, die die Pathogenese der Schistosomiasis auslösenden Eier von *S. mansoni*. Offensichtlich wird auch die Th2-Antwort während einer Schistosomeninfektion durch das Eistadium induziert, da die Injektion von lebenden Eiern, wasserlöslichem Ei-Antigen (SmEA) oder exkretorisch-/sekretorischen Eiprodukten in Mäuse jeweils zu einer Th2-Induktion führt [96]. Desweiteren sezernieren humane basophile Granulozyten die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 sowie Histamin, wenn sie *in vitro* mit SmEA inkubiert werden [34, 108]. Ferner werden in den Schistosomeneiern antientzündliche Faktoren (s. u.) gebildet.

1.4.2.1 Immunmodulatorische Faktoren aus Schistosomen-Eiern

Bislang konnten aus den Eiern von *S. mansoni* drei Hauptantigene isoliert, sequenziert und charakterisiert werden: Omega-1, IPSE/alpha-1 und Kappa-5.

Kappa-5, nicht wie Omega-1 und IPSE/alpha-1 von intakten Eiern freigesetzt, ist hauptverantwortlich für die gegen SmEA gerichtete IgE-Immunantwort des Wirts. Seine biologische Funktion ist (noch) nicht bekannt [111].

Omega-1 konditioniert dendritische Zellen (DC) IL-4 unabhängig zur Induktion einer Th2-Antwort [33].

IPSE/alpha-1, dessen immunmodulatorische Kapazität im Rahmen dieser Doktorarbeit eingehender untersucht werden sollte, induziert die Freisetzung

von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten [108]. IPSE/alpha-1 ist ein homodimeres Glykoprotein von 36 kDa Größe [108], welches mit rund 80 % den größten Teil der exkretorisch-/sekretorischen Eiprodukte von *S. mansoni* ausmacht [81]. Entsprechend seiner Eigenschaft IL-4 aus Basophilen freizusetzen, wurde es zunächst als IPSE für „IL-4 induzierendes Prinzip aus *S. mansoni*-Eiern“ bezeichnet [108]. Erstmals beschrieben wurde dieses Protein bereits 1991 von Dunne et al. unter dem Namen alpha-1 als kationisches Schistosomen-Ei-Antigen [27]. Spätere Untersuchungen zeigten, dass IPSE und alpha-1 identisch sind [109]. IPSE/alpha-1 wird ausschließlich in den Eiern von *S. mansoni* exprimiert. Offenbar besitzt es keinen eigenen Rezeptor, sondern scheint vielmehr ein Immunglobulin-bindender Faktor zu sein, der basophile Granulozyten über die Interaktion mit an FcεRI gebundenem IgE aktiviert [112]. Humane basophile Granulozyten degranulieren bereits nach Inkubation mit geringen Mengen IPSE/alpha-1 unter Freisetzung von IL-4, IL-13 und Histamin [108]. Auch wenn IPSE/alpha-1 keine Th2-Antwort induziert [33], vermag es möglicherweise, eine bestehende Th2-Antwort – vermittelt durch Basophile – zu verstärken und damit den Wirt zu schützen.

1.4.2.2 Basophile Granulozyten als Bindeglied zwischen Parasit und Wirt

Erst vor kurzem gerieten basophile Granulozyten, kurz Basophile genannt, in den Fokus immunologischer Forschung [64, 113, 138]. Sie stellen die kleinste Subpopulation der Granulozyten im peripheren Blut dar und machen im Differentialblutbild 1 % aller Leukozyten aus. Im Falle einer Entzündung verlassen basophile Granulozyten die Blutbahn und werden ins Gewebe rekrutiert [138]. Charakteristisch für Basophile ist der gelappte, aus zwei bis vier Segmenten bestehende Zellkern, der von zytoplasmatischen Granula überlagert ist. Diese Granula enthalten Mediatoren (s. u.) und können mit positiv geladenen basischen Farbstoffen (z. B. Methylenblau oder Hämotoxylin) angefärbt werden. Einen wichtigen Stimulus für Basophile stellt das Zytokin IL-3 dar, welches positiv ihr Wachstum, ihre Entwicklung und ihre Zytokinsekretion beeinflusst. Zudem verlängert dieser hämatopoetische Wachstumsfaktor die Überlebenszeit von Basophilen [114, 121].

Innerhalb des menschlichen Immunsystems spielen basophile Granulozyten eine entscheidende Rolle. Sie sind integraler Bestandteil der Immunantwort gegen parasitäre Würmer [88, 139]. Während einer Infektion mit Helminthen ist die Basophilenanzahl im peripheren Blut von Mäusen erhöht [88] und Basophile werden in infizierte Gewebe rekrutiert. Sie wurden bei einer Infektion mit *S. mansoni* in großer Zahl in der Milz und in den peripheren Lymphknoten nachgewiesen [100]. Zudem sind die Basophilen während einer Schistosomeninfektion wesentlich an der Induktion von Granulomen, die eine bedeutende Rolle beim Schutz der infizierten Gewebe vor toxischen Eiprodukten übernehmen, beteiligt [4, 139].

Ferner sind basophile Granulozyten eng mit allergischen Reaktionen assoziiert und hier die wichtigsten Produzenten der Zytokine IL-4 und IL-13 [17, 44]. Dabei führt die Bindung von Allergenen an Komplexe aus IgE und Typ I Fcε-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche der Basophilen zu einer Aktivierung der Zellen. Die brückenartige Vernetzung der rezeptorgebundenen IgE-Moleküle setzt aus den Granula der Basophilen Entzündungsmediatoren, wie Histamin,

Proteoglykane (z. B. Heparin und Chondroitin) und proteolytische Enzyme (z. B. Elastase und Lysophospholipase) frei. Zusätzlich sezernieren Basophile Lipidmediatoren, wie Leukotriene und Prostaglandine, und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF). Während Histamin und Proteoglykane in gespeicherter Form in den zytoplasmatischen Granula vorliegen, werden die letztgenannten ebenso wie ein Großteil des IL-4 und das IL-13 erst zu Beginn der anaphylaktischen Reaktion neu synthetisiert [115]. Mehrere Studien belegen, dass basophile Granulozyten nach Stimulation mit Antigenen bereits sehr früh beginnen, Zytokine freizusetzen. So lässt sich präformiertes IL-4 schon nach fünf bis zehn Minuten in kleinsten Mengen nachweisen, während es innerhalb von vier Stunden nach immunologischer Aktivierung durch *de novo*-Synthese maximale Quantität erreicht [17]. Im Gegensatz zu der schnellen und steil ansteigenden Freisetzung von IL-4 nimmt die Konzentration an IL-13 nur langsam nach mehreren Stunden messbar zu und erlangt ihren Höhepunkt nach 20 Stunden [73].

Neben Allergenen aktivieren auch Faktoren parasitärer Würmer im Zuge einer Helmintheninfektion Basophile und regen diese zur Freisetzung der o. g. Mediatoren an [121]. Eine zentrale Position nehmen auch hier die beiden Zytokine IL-4 und IL-13 ein. Sie sind wesentlich an der Polarisierung der T-Zellantwort in Richtung Th2 beteiligt [49, 64, 93, 108, 114]. IL-4 fördert *in vitro* die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen [1]. IL-13 hemmt die Synthese von IL-12 sowie Interferon-(IFN)- γ und beeinflusst damit ebenso die Polarisierung der Zellen in Richtung einer Th2-Antwort [142]. Für beide Zytokine ist weiter beschrieben, dass sie die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Lipopolysaccharid-(LPS)-aktivierte Monozyten hemmen [82, 136, 142] und zur alternativen Aktivierung von Makrophagen führen [30, 80]. Damit besitzen IL-4 und IL-13 zweifellos wichtige immunregulative und entzündungshemmende Eigenschaften [65].

Da das kodierende Gen für IL-13 in unmittelbarer Nähe zum Genlokus für IL-4 liegt, sind wahrscheinlich beide Zytokine durch Genduplikation entstanden [140]. Und ihr überlappendes Wirkspektrum kann darauf zurückgeführt werden, dass sie den gleichen Rezeptor, genau genommen die α -Kette des IL-4 Rezeptors (IL-4R α), nutzen [87].

1.4.2.3 Die Immunmodulation durch IPSE/ α -1

Der von den Eiern des helminthischen Parasiten *S. mansoni* sekretierte Faktor IPSE/ α -1 setzt aus basophilen Granulozyten IL-4 und IL-13 frei [108]. Bereits in meiner Diplomarbeit – 2010 in der Forschungsgruppe (FG) Zelluläre Allergologie am Forschungszentrum Borstel (FZB) – konnte ich zeigen, dass dadurch die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 aus LPS-stimulierten Monozyten in der Kokultur gehemmt wird (siehe Abbildung 1.3, Seite 10).

Isolierte humane Monozyten wurden hierzu 24 Stunden in Gegenwart von LPS, IL-4, *E. coli*-IPSE/ α -1 und Basophilen desselben Spenders kultiviert und in den Zellkulturüberständen die von Monozyten sezernierten Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 sowie von Basophilen freigesetztes IL-4 und IL-13 bestimmt. Die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Monozyten ließ sich durch einen gegen IL-4 gerichteten Antikörper komplett aufheben (nicht dargestellt). Womit sich durch IPSE/ α -1 induziertes, basophiles IL-4 als potenter Inhibitor der Produktion proinflammatorischer Zytokine erwiesen hatte.

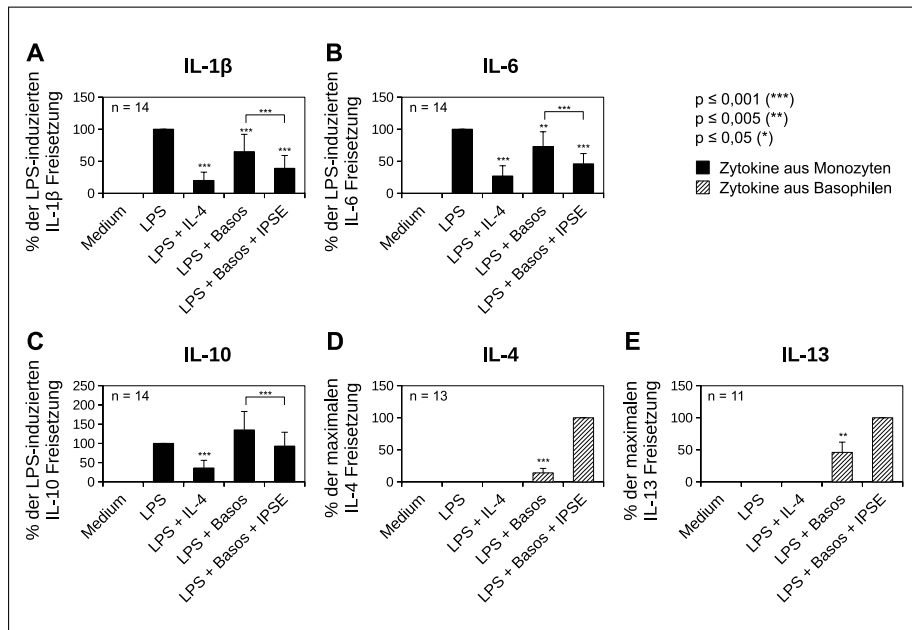


Abbildung 1.3: Die LPS-induzierte Freisetzung von IL-1 β und IL-6 aus humanen Monozyten wird in der Kokultur mit IPSE/ α -1-stimulierten basophilen Granulozyten gehemmt. Die Daten für die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 wurden auf die Zytokinkonzentration nach LPS-Stimulation der Monozyten (100 %) normalisiert, da die Zytokinfreisetzung aus Monozyten stark spenderabhängig variiert. Für die Zytokine IL-4 und IL-13 wurde der Ansatz der maximalen Interleukinfreisetzung (der Monozyten, LPS, Basophile und *E. coli*-IPSE enthielt) als Bezugspunkt der Normalisierung gewählt.

(Dauer: 24 h, Monozyten und basophile Granulozyten je 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/ α -1 100 ng/ml)

1.5 Zielsetzung

Um die Immunantwort des Wirts als Reaktion auf eine Infektion mit helminthischen Parasiten wie *Schistosoma mansoni* zu unterdrücken, sezernieren die Parasiten, bzw. ihre Eier, immunmodulatorisch wirksame Moleküle. Diese Moleküle, deren Wirkmechanismus bislang jedoch nur unzureichend erforscht ist, könnten das Potential zur Therapie von Th2-assoziierten, entzündlichen Erkrankungen wie Asthma und Allergien besitzen. Einer dieser Faktoren wurde als IPSE/ α -1, das von den Eiern von *S. mansoni* freigesetzt wird, identifiziert. IPSE/ α -1 bewirkt die Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten [108]. Beiden Zytokinen werden antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Wie bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) gezeigt, wird die Freisetzung von IL-1 β und IL-6 aus mit LPS stimulierten Monozyten IL-4-vermittelt gehemmt, wenn jene mit IPSE/ α -1-stimulierten Basophilen kokultiviert werden (siehe Abbildung 1.4, Seite 11).

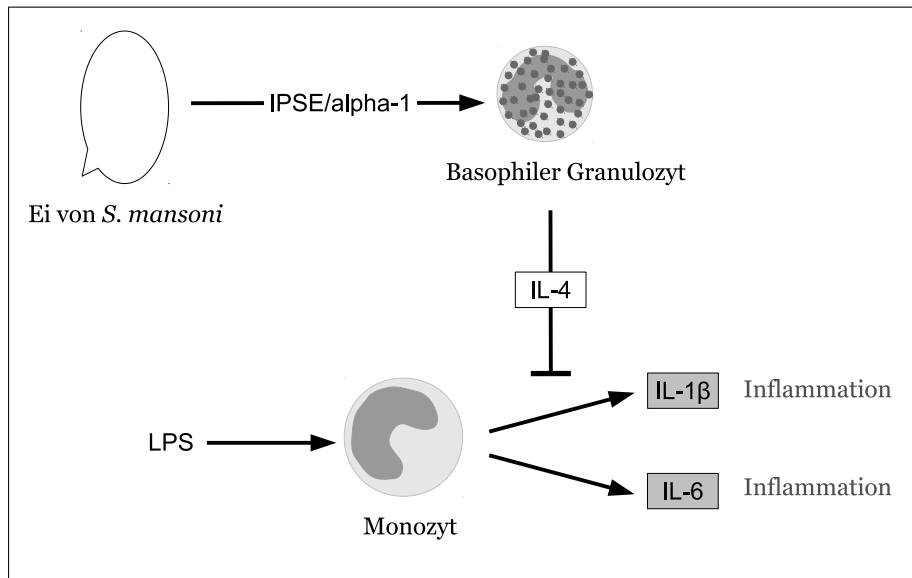


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus humanen Monozyten in der Kokultur mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hemmung der Entzündungsreaktion näher charakterisiert werden. Folgende Fragen bezüglich des Hemmeffektes von IPSE/alpha-1 und seiner immunmodulatorischen Relevanz *in vivo* und *in vitro* standen hierbei im Mittelpunkt:

- *ex vivo*-Untersuchungen an Geweben *S. mansoni*-infizierter Mäuse
 - Wandern Basophile in Granulome um *S. mansoni*-Eier ein?
 - Ist auch IPSE/alpha-1 im *S. mansoni*-Eigranulom nachweisbar und findet eine Interaktion mit Basophilen statt?
 - Gibt es trotz überlappender Eigenschaften von Basophilen und Mastzellen Unterschiede in ihrer Gewebeverteilung?
- Aktivierung der Basophilen
 - Welchen Einfluss haben verschiedene TLR-Agonisten auf die Freisetzung von IL-4 aus basophilen Granulozyten?
- Mechanismus der *in vitro*-Inhibierung der proinflammatorischen Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten
 - Bedarf es eines Zell-Zell-Kontaktes zwischen Basophilen und Monozyten zur Ausübung der Hemmung?
 - Interagieren Basophile und Monozyten?
 - Welchen Einfluss hat basophiles IL-13 in der *in vitro*-Kultur?
 - Wird die Freisetzung von IL-10 aus LPS-stimulierten Monozyten in der Kokultur beeinflusst?

- Phänotyp der kokultivierten Monozyten
 - Wie verändern sich Monozyten, wenn sie in Gegenwart von IL-4 kultiviert werden und gibt es Hinweise auf eine alternative Aktivierung?
- Relevanz der *in vitro*-Befunde für die *in vivo*-Situation
 - Lässt sich die Hemmung auch in einem komplexeren Kokultursystem mit mononukleären Zellen (PBMC) nachweisen?

Kapitel 2

Material

2.1 Geräte

| Gerät | Gerätename; Hersteller |
|--------------------------|--|
| Autotechnicon | Hypercenter XP; SHADON, Pittsburgh, USA |
| Brutschrank | Class II Type A/B3; Nuaire, Plymouth, USA |
| Casy | CASY TT; Schärfe System, Reutlingen, D |
| Durchflusszytometer | LSR II; BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Dampfgarer | ULTRA COMPACT VC 1002; Tefal, Rumilly, F |
| ELISA-Reader | MRX Microplate Reader; Dynatech Laboratories, Guernsey, GB |
| ELISA-Washer | Tecan 96PW; Tecan, Männedorf, CH |
| Heizbad | GFL1052; GFL, Burgwedel, D |
| Mikroskop | ECLIPSE TS100; Nikon, Tokio, J |
| Mikroskop | Olympus IX-81; Olympus, Tokio, J |
| Mikroskop | Zeiss, Jena, D |
| Mikroskop | wilovert; Will, Wetzlar, D |
| Objektträgergestelle | Shandon Sequenza; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D |
| Objektträger Strecktisch | Medite, Burgdorf, D |
| Paraffingießstation | Leica EG1140C; Leica, Nussloch, D |
| pH-Meter | Mettler Toledo, Greifensee, CH |
| Rotationsmikrotom | Leica RM 2155; Leica, Nussloch, D |
| Schüttler | KL2; Edmund Bühler, Tübingen, D |
| Trockenschrank | memmert, Schwabach, D |
| Wasserbad | MGW Lauda C20; LAUDA, Lauda-Königshofen, D |
| Zentrifuge | Cytospin 3; Shandon Scientific, Cheshire, UK |
| Zentrifuge | J2-21; BECKMAN COULTER, Galway, IRL |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0R; Heraeus, Hanau, D |
| Zentrifuge | Mikrozentrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg, D |
| Zentrifuge | Varifuge 3.0R; Heraeus, Hanau, D |

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Für die Arbeit wurden nachstehende Chemikalien und Reagenzien verwendet, die mindestens den Reinheitsgrad p. a. aufwiesen.

Produkt

anti-His-IPSE/alpha-1 Antikörper
 anti-human CD14 (FITC) Antikörper
 anti-human CD206 (FITC) Antikörper
 anti-human CD209 (PE) Antikörper
 anti-human IgE Antikörper
 anti-human IL-4 Antikörper
 anti-human IL-13 Antikörper
 anti-Maus Ig Kompensation Partikel
 anti-Maus MCP8 Antikörper
 anti-Maus IgG AF488
 anti-Ratte IgG AF633 Antikörper
 Apotransferrin
 Aqua destillata
 Basophil Isolation Kit II
 Casy[®]ton
 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
 Di-Natriumhydrogenphosphat
 Dulbecco's PBS
 EDTA (Titrierkomplex III)
 Ethanol, 96 % , vergällt
 Fetales Kälberserum (FCS)
 HBSS 1x
 HMG-1
 Humanes IL-3

 Humanes IL-4
 Humanes IL-13
 Humanserum (HS)
 IL-1 β OptEIA[™] ELISA-System
 IL-4 Eli-pair ELISA-System
 IL-6 OptEIA[™] ELISA-System
 IL-10 OptEIA[™] ELISA-System
 IL-13 Eli-pair ELISA-System
 IMDM (1x)
 Insulin
 Ionomycin
 IPSE/alpha-1 (*E. coli*)
 IPSE/alpha-1 (HEK)
 IPSE/alpha-1 (natürlich)
 Kaliumchlorid
 Kaliumdihydrogencarbonat
 Kaliumdihydrogenphosphat
 LPS

Firma

Labsoft Diagnostics AG, Halle, D
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
 BioSource, Camarillo, USA
 R&D, Minneapolis, USA
 R&D, Minneapolis, USA
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 BioLegend, San Diego, USA
 Jackson IR, Carlsbad, USA
 Invitrogen, Carlsbad, USA
 Sigma, München, D
 Braun, Melsungen, D
 Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
 Innovatis, Reutlingen, D
 Invitrogene, Eugene, USA
 Roth, Karlsruhe, D
 PAA, Pasching, A
 Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt, D
 Invitrogen, Carlsbad, USA
 PAA, Pasching, A
 Sigma, München, D
 Kirin Brewery, Takasaki-shi,
 Gunma, J
 ImmunoTools, Friesoythe, D
 ImmunoTools, Friesoythe, D
 FZB (Zell. Allerg.), Borstel, D
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 Diaclone, Besancon, F
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 BD Biosciences, Heidelberg, D
 Diaclone, Besancon, F
 PAA, Pasching, A
 Sigma, München, D
 Sigma, München, D
 FZB (Zell. Allerg.), Borstel, D
 FZB (Zell. Allerg.), Borstel, D
 FZB (Zell. Allerg.), Borstel, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Merck, Darmstadt, D
 FZB, Borstel, D

Produkt

LSM 1077 Lymphocyte (Ficoll)
May-Grünwald-Färbelösung
Maus IgG1 (APC)
Maus IgG1 (FITC)
Maus IgG1 (PE)
Maus IgG2a (FITC)
Natriumchlorid
Natriumcitrat
Natriumhydroxid
Normal Ziegenserum
Paraplast Plus (Paraffin)
Penicillin / Streptomycin
Percoll™
Prolong Gold®
Rinderserumalbumin (BSA)
Salzsäure
Schwefelsäure
TNF OptEIA™ ELISA-System
Triton X100
Trypanblau
Tetramethylbenzidin (TMB)
Tween® 20
Ziegenserum

Firma

PAA, Pasching, A
Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
DAKO, DK
Pharmingen (BD), San Diego, USA
BioLegend, San Diego, USA
Roth, Karlsruhe, D
Roth, Karlsruhe, D
Roth, Karlsruhe, D
Jackson IR, Avondale, USA
Sherwood Medical, St. Louis, USA
PAA, Pasching, A
GE Healthcare, Uppsala, S
Life Technologies, Eugene, USA
PAA, Pasching, A
Roth, Karlsruhe, D
Merck, Darmstadt, D
BD Biosciences, Heidelberg, D
Roth, Karlsruhe, D
Sigma, München, D
tebu-bio, Boeuchout, B
Roth, Karlsruhe, D
Invitrogen, Maryland, USA

2.3 Häufig verwendete Puffer und Nährmedien

Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wurde vorgefiltertes und demineralisiertes Wasser verwendet. Puffer und Medien für die humane Zellkultur sowie für die durchflusszytometrischen Analysen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Spritzenfilter, Firma Sarstedt). Für die Zellkultur verwendetes FCS wurde 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert (FCS, hi).

2.3.1 Arbeiten mit Zellen

2.3.1.1 Elutriationspuffer zur Aufreinigung von Zellen

HBSS mit 0,1 % BSA (pH 7,4):

- HBSS-Lösung (PAA, Pasching, A)
- 0,1 % w/v BSA

2.3.1.2 Kulturmedium

1x IMDM (PAA, Pasching, A) versetzt mit:

- 50 µg/ml Apotransferrin
- 5 µg/ml Insulin
- 100 U/ml Penicillin G
- 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat
- 10 % FCS, hi
- 2,5 ng/ml IL-3

2.3.2 ELISA

2.3.2.1 Waschpuffer

1x PBS-Lösung mit 0,05 % Tween 20 (pH 7,5):

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O
- 2 mM KH₂PO₄
- 0,05 % Tween[®] 20

2.3.2.2 Antikörper-Bindepuffer für IL-1β, IL-6, IL-10 und TNF

0,1 M Natriumcarbonat-Lösung (pH 9,5):

- 84,9 mM NaHCO₃
- 15 mM Na₂CO₃
- 10 M NaOH zur pH-Einstellung

2.3.3 Durchflusszytometrie

2.3.3.1 FACS-Puffer

1x PBS-Lösung (PAA, Pasching, A) versetzt mit:

- 0,2 % w/v BSA

2.3.3.2 Färbepuffer

1x PBS-Lösung (PAA, Pasching, A) versetzt mit:

- 1 % w/v BSA
- 2 % v/v FCS
- 1 % v/v HS

2.3.4 Immunhistochemie

2.3.4.1 Citratpuffer

0,01 M Natriumcitratlösung mit 0,05 % Tween 20 (pH 6,0):

- 10 mM $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,05 % Tween[®] 20

2.3.4.2 10x PBS

10x PBS-Lösung:

- 1,37 M NaCl
- 27 mM KCl
- 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 20 mM KH_2PO_4

2.3.4.3 PBS-Tween

1x PBS-Lösung versetzt mit:

- 0,05 % Tween[®] 20

2.3.4.4 Färbepuffer

1x PBS-Lösung versetzt mit:

- 0,1 % Triton X100
- 0,05 % Tween[®] 20

2.3.4.5 Blockierungspuffer

1x Färbepuffer für Immunhistochemie (s. o.) versetzt mit:

- 1 % w/v BSA
- 2 % v/v Ziegenserum

2.4 Häufig verwendete Stimuli in der Zellkultur

Die zur Stimulation oder auch zur Blockierung bestimmter Signalwege in der Kokultur eingesetzten Substanzen sind in den Tabellen 2.3 – 2.5 aufgeführt. Angegeben sind jeweils die häufigsten eingesetzten Konzentrationen und die im weiteren Text sowie in den Abbildungen verwendeten Kurzbezeichnungen.

2.4.1 Antikörper

Für den Basophilenstimulationstest wurde aus der anti-human IgE Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml nach Vorverdünnung auf 1.250 ng/ml eine 1:5 Verdünnungsreihe erstellt: 1.250 – 250 – 50 – 10 – 2 – 0,4 ng/ml (siehe Kapitel 3.3.1, Seite 26).

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Antikörper

| Bezeichnung | Abkürzung | Hersteller | Konzentration |
|-----------------------|--------------|------------|-------------------|
| Ziege anti-human IL-4 | anti-h IL-4 | R&D | 1 µg/ml |
| Ziege anti-human IgE | anti-h IgE | BioSource | 1.250 ng/ml u. a. |
| Maus anti-human IL-13 | anti-h IL-13 | R&D | 10 µg/ml |

2.4.2 Zytokine

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten rekombinanten Zytokine

| Bezeichnung | Abkürzung | Hersteller | Konzentration |
|---------------|-----------|-------------|------------------|
| humanes IL-3 | IL-3 | Kirin | 2,5 ng/ml |
| humanes IL-4 | IL-4 | ImmunoTools | 0,12 ng/ml |
| humanes IL-13 | IL-13 | ImmunoTools | 0,12 ng/ml u. a. |

2.4.3 Weitere Stimuli

Für den Basophilenstimulationstest wurden jeweils 1:5 Verdünnungsreihen der *E. coli*-IPSE Stammlösung (0,12 mg/ml) beginnend mit 2.500 ng/ml sowie der HMG-1 Stammlösung (1 mg/ml) beginnend mit 500 ng/ml erstellt.

Tabelle 2.5: Liste weiterer Stimulantien

| Bezeichnung | Abkürzung | Hersteller | Konzentration |
|------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| HMG-1 | HMG-1 | Sigma | 100 ng/ml u. a. |
| Ionomycin | Ionomycin | Sigma | 2 µmol/l |
| IPSE aus <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> -IPSE | FZB (09.02.07) | 100 ng/ml u. a. |
| IPSE aus HEK-Zellen | HEK-IPSE | FZB (20.08.07) | 100 ng/ml |
| IPSE aus SmEA | nIPSE | FZB (01.06.07) | 100 ng/ml |
| LPS (<i>S. friedenaui</i>) | LPS | H. Brade, FZB | 10 ng/ml |

2.5 ELISA-Systeme

Für die Ermittlung von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurden die in Tabelle 2.6 auf Seite 19 aufgeführten ELISA-Systeme verwendet.

Tabelle 2.6: ELISA-Systeme

| Test | ELISA-System | Hersteller |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| humanes IL-1 β | BD OptEIA TM | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| humanes IL-4 | EliPair | Diaclone, Besancon, F |
| humanes IL-6 | BD OptEIA TM | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| humanes IL-10 | BD OptEIA TM | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| humanes IL-13 | EliPair | Diaclone, Besancon, F |
| humanes TNF | BD OptEIA TM | BD Biosciences, Heidelberg, D |

2.6 Antikörper in der Durchflusszytometrie

2.6.1 Primärantikörper

Alle in der Durchflusszytometrie verwendeten u. g. Primärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:20 in FACS-Puffer verdünnt.

Tabelle 2.7: Antikörper für FACS-Analysen

| Antikörper | Isotyp | Fluoro- chrom | Hersteller |
|--------------|--------|------------------|--------------------------------|
| anti-h CD14 | mIgG2a | FITC | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| anti-h CD206 | mIgG1 | FITC | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| anti-h CD209 | mIgG1 | PE | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D |

2.6.2 Isotypkontrollen

Zur Beurteilung des Ausmaßes unspezifischer Bindung der in Tabelle 2.7 aufgelisteten Primärantikörper wurden Isotypkontrollen eingesetzt. Auch diese wurden 1:20 in FACS-Puffer verdünnt.

Tabelle 2.8: Isotypkontrollen für FACS-Analysen

| Isotyp | Fluoro- chrom | Hersteller |
|--------|------------------|---------------------------------------|
| mIgG1 | APC | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D |
| mIgG1 | FITC | DAKO, DK |
| mIgG1 | PE | Pharmingen, San Diego, USA |
| mIgG2a | FITC | BioLegend, San Diego, USA |

2.7 Antikörper in der Immunhistochemie

Neben den u. g. Antikörpern wurde auch der Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt.

Tabelle 2.9: Antikörper in der Immunhistochemie

| Antikörper (Isotyp) | Hersteller | Ausgangs- konzentration | Verdünnung |
|---|-------------------------------|----------------------------|------------|
| anti-His-IPSE/alpha-1 (Maus IgG, Klon 744B7) | Labsoft Diag. AG, Halle, D | 1,13 mg/ml | 1:100 |
| anti-Maus IgG AF488 (Ziege) | Jackson IR, Carlsbad, USA | 1,5 mg/ml | 1:200 |
| anti-Maus MCP8 (Ratte IgG2a) | BioLegend, San Diego, USA | 0,5 mg/ml | 1:500 |
| anti-Ratte IgG AF633 (Ziege) | Invitrogen, Carlsbad, USA | 2 mg/ml | 1:1.000 |

Kapitel 3

Methoden

3.1 Aufreinigung humaner basophiler Granulozyten aus peripherem Blut

Die humanen Basophilen wurden in einem dreistufigen Verfahren aufgereinigt, welches im Anschluss in seinen Einzelschritten beschrieben wird. Entwickelt wurde diese Methode von Haisch et al. Ende der 90er Jahre [48]. Die basophilen Granulozyten wurden aus frisch entnommenem venösem Blut gesunder Spender gewonnen, das direkt bei der Abnahme mit 10 % (v/v) einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 7,4) als Antikoagulans versetzt wurde. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck lag vor (Aktenzeichen 06-188).

3.1.1 Ficoll/Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, das die unterschiedliche Dichte von Blutzellen ausnutzt und zur Anreicherung von Zellen gleicher Dichte führt.

15 ml einer 100:6 Ficoll-Percoll-Mischung (Dichte = 1.080 g/l) wurden mit 30–35 ml EDTA-Blut überschichtet und 30 Minuten bei 4 °C und 500 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei bildete sich von oben nach unten folgender Gradient aus (siehe auch Abbildung 3.1, Seite 22):

- Plasma
- Interphase mit Basophilen, Monozyten und Lymphozyten
- Ficoll/Percoll-Gemisch mit Neutrophilen und Eosinophilen
- Erythrozyten

Die Interphase wurde abgenommen, mit der doppelten Menge an kaltem PBS gewaschen (10 Minuten, 4 °C und 500 x g) und in HBSS/BSA-Puffer aufgenommen.

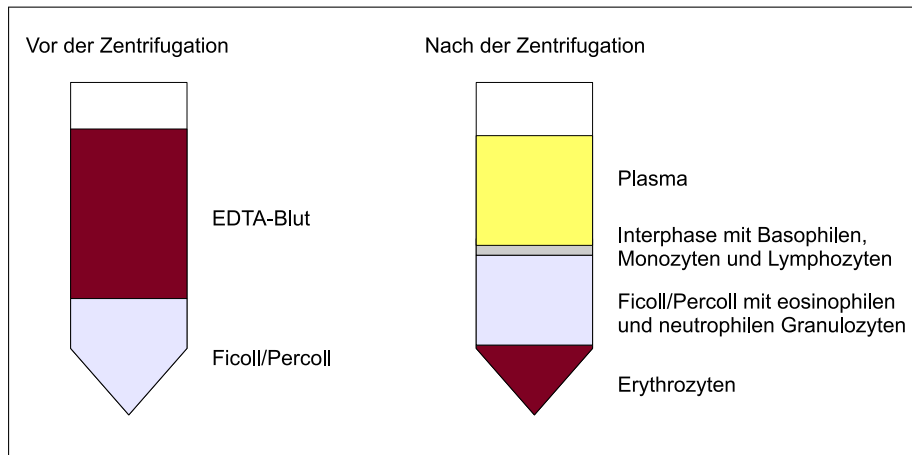


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll/Percoll-Gradienten zur Isolierung basophiler Granulozyten

3.1.2 Gegenstromelutriation

Die Elutriation ist ein Zwischenschritt der Aufreinigung. Sie trennt die basophilen Granulozyten von Verunreinigungen mit Erythrozyten und Thrombozyten ohne große Zellverluste und führt zu einer Anreicherung der Basophilen. Das der Auftrennung zugrundeliegende Prinzip ist die Gegenstromzentrifugation (siehe Abbildung 3.2, Seite 23). Dabei wirken zwei entgegengesetzte Kräfte: die von der Drehachse nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, die von der Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors abhängt, und die Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Elutriationspuffers in Richtung der Rotationsachse durch eine geeichte Pumpe bestimmt wird. Das Verhältnis von Rotations- zu Strömungsgeschwindigkeit legt fest, welche Zellarten entsprechend ihren physischen Eigenschaften in der Elutriationskammer verbleiben und welche hindurchgespült werden.

Zunächst wurde die Anlage mit HBSS/BSA-Puffer gespült. Bei $1.750 \times g$ und einer Fließgeschwindigkeit von 30 ml je Minute wurde dann die Zellsuspension aus der Dichtegradientenzentrifugation in das System eingespeist. Die ersten 200 ml des Durchflusses wurden jeweils verworfen. Anschließend wurde die Flussrate auf 33 ml je Minute erhöht und weitere 300 ml des Durchflusses wurden verworfen. Zuletzt wurden bei einer Flussrate von 42 ml je Minute 200 ml Durchfluss gesammelt (siehe Tabelle 3.1, Seite 22), über Zentrifugation auf 4 ml eingeeengt und die Zellzahl bestimmt.

Tabelle 3.1: Elutriationsprotokoll für Basophile Granulozyten

| Geschwindigkeit in ml/min | aufgefangenes Volumen in ml |
|---------------------------|-----------------------------|
| 30 | 200 (verworfen) |
| 33 | 300 (verworfen) |
| 42 | 200 |

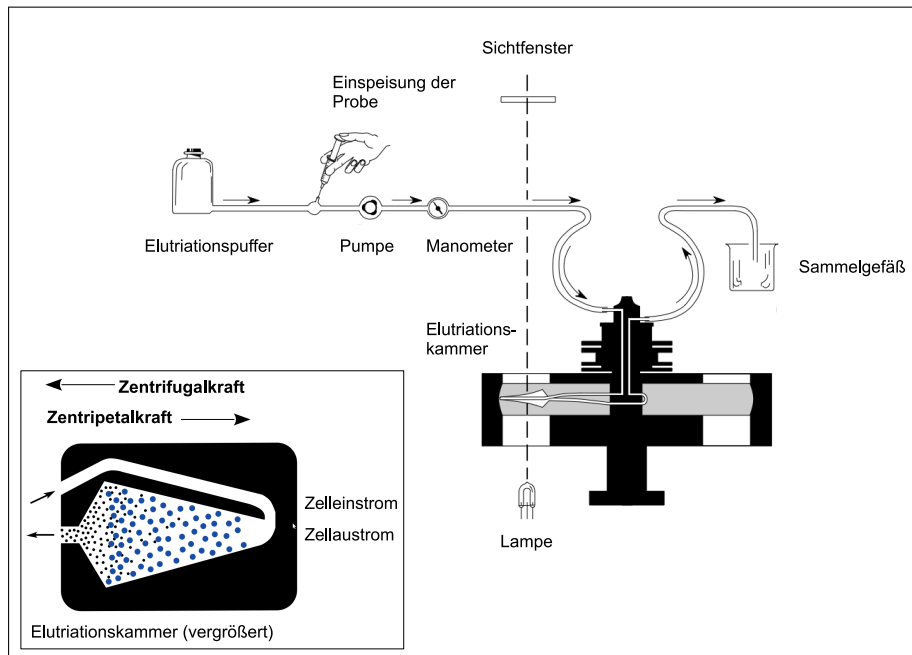


Abbildung 3.2: Prinzip der Elutriation, modifiziert nach Beckman Coulter, Inc. (1785A(T): Elutriation Protocols)

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (siehe Formel zur Zellzahlbestimmung Kapitel 3.7.2, Seite 31).

3.1.4 Negative Selektion via immunomagnetischer Partikel

Bei der negativen Selektion binden eisenhaltige Partikel über eine Brücke aus einem primären und einem sekundären Antikörper an verschiedene nicht basophile Zellen in der Zellsuspension. B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, Erythrozyten, Thrombozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie T-Zellen werden auf diese Weise über ihre CD-Oberflächenmoleküle markiert. Die Suspension wird auf eine Trennsäule aufgetragen, deren Matrix durch ein von außen angelegtes Magnetfeld magnetisiert wird. Während die markierten Zellen an der Säulenmatrix haften bleiben, werden die nicht markierten basophilen Granulozyten hochrein gesammelt. Das diesem Verfahren zugrunde liegende Prinzip wird auch als magnetic-activated cell sorting[®], kurz MACS, bezeichnet.

Das Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) wurde mit folgenden Ausnahmen befolgt: Als Puffer wurde anstelle von PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA (pH 7,2) der Elutriationspuffer (HBSS/BSA-Puffer) verwendet und auf den Waschschrift nach der Inkubation der Zellen mit den Antikörpern vor ihrer Auftragung auf die Säule wurde verzichtet.

Der Durchfluss wurde über Zentrifugation eingeengt, in 500 µl HBSS/BSA-Puffer aufgenommen und darin die Zellzahl sowie die Basophilenreinheit bestimmt.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Basophilenreinheit

Zur Quantifizierung der basophilen Granulozyten wurden diese erneut mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Formel zur Zellzahlbestimmung Kapitel 3.7.2, Seite 31).

Zur Bestimmung der Reinheit wurden Zytospin-Präparate mit 150.000 Zellen je Objektträger (25 x *g*, 1 min) angefertigt und mit 1 ml May-Grünwald-Lösung für drei Minuten gefärbt. Im Lichtmikroskop können Basophile aufgrund ihrer dunkelvioletten gefärbten Granula von anderen Zellen unterschieden werden. Der prozentuale Anteil der Basophilen an der Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen ermittelt.

Mit diesem Verfahren konnten Basophile mit einer Reinheit zwischen 97 und 99 % gewonnen werden. Die kontaminierenden Zellen waren zumeist Monozyten. Auf eine weitere Aufreinigung der Basophilen wurde verzichtet, da die Basophilen ohnehin mit Monozyten bzw. PBMC kokultiviert wurden. Die Zellzahl wurde auf $1,25 \times 10^6$ /ml Kulturmedium eingestellt.

3.2 Aufreinigung humaner PBMC und Monozyten aus peripherem Blut

Die Aufreinigung der PBMC und Monozyten erfolgte in einem der Aufreinigung basophiler Granulozyten ähnlichen Verfahren, das im Anschluss in seinen Unterschieden beschrieben wird – jedoch ohne negative Selektion. Die PBMC und Monozyten wurden wie auch die Basophilen aus frisch entnommenem venösen Blut gesunder Spender gewonnen, das direkt bei der Abnahme mit 10 % (v/v) einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 7,4) als Antikoagulant versetzt wurde.

3.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

15 ml Ficoll (Dichte = 1.077 g/l) wurden mit 30–35 ml EDTA-Blut überschichtet und 15 Minuten bei 20 °C und 300 x *g* zentrifugiert. 5–10 ml des Überstandes wurden verworfen. Der Rest wurde weitere 20 Minuten bei 20 °C und 500 x *g* (ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei bildete sich von oben nach unten folgender Gradient aus:

- Plasma
- Interphase mit PBMC (Monozyten und Lymphozyten)
- Ficoll mit neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten
- Erythrozyten

Die Interphase wurde abgenommen, mit der doppelten Menge an kaltem PBS gewaschen (10 Minuten, 4 °C und 500 x *g*) und in HBSS/BSA-Puffer aufgenommen. Hier endete die Aufreinigung humaner PBMC.

3.2.2 Gegenstromelutriation (zur weiteren Aufreinigung der Monozyten)

Eine Einführung in die Technik wurde in Kapitel 3.1.2 auf Seite 22 gegeben.

Zunächst wurde die Anlage mit HBSS/BSA-Puffer gespült. Bei $1.750 \times g$ und einer Fließgeschwindigkeit von 24 ml je Minute wurde dann die Zellsuspension aus der Dichtegradientenzentrifugation in das System eingespeist. Die ersten 200 ml des Durchflusses wurden verworfen. Anschließend wurde die Flussrate in Stufen erhöht und verschiedene Volumina des Durchflusses wurden gesammelt (siehe Tabelle 3.2, Seite 25). Die Monozyten waren für gewöhnlich in den ab einer Fließgeschwindigkeit von 38 ml je Minute gesammelten Fraktionen zu finden, während in den frühen Fraktionen die kleineren Lymphozyten enthalten waren.

Tabelle 3.2: Elutriationsprotokoll für Monozyten

| Geschwindigkeit in ml/min | aufgefangenes Volumen in ml |
|---------------------------|-----------------------------|
| 24 | 200 (verworfen) |
| 25 | 100 |
| 27 | 50 |
| 29 | 50 |
| 32 | 100 |
| 33 | 100 |
| 35 | 100 |
| 38 | 100 |
| 39 | 100 |
| 40 | 100 |
| 43 | 100 |
| 45 | 100 |
| Stopp | 50 |

3.2.3 Zellzahlbestimmung am Casy[®]

Um einen ersten Überblick über die Zellzahl und Reinheit der gewonnenen Fraktionen zu erhalten, wurden die Zellen 1:100 mit einem schwachen Elektrolyten (Casyton) verdünnt und am Casy[®] (Schärfe System, Reutlingen, D), welches nach dem Prinzip der elektronischen Pulsflächenanalyse arbeitet, vermessen.

Dabei werden die Zellen mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Größe gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Die dadurch hervorgerufene Widerstandsänderung stellt ein Maß für das Volumen der Zellen dar. Aus den Einzelmessungen wird dann das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse) berechnet und schließlich aus der volumenlinearen Originalverteilung eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet. Ferner ermöglicht dieses Verfahren die getrennte Erfassung lebender und toter Zellen. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, das vom Volumen der Zelle abhängt. Tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran können den Strom nicht mehr ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst.

Nur die Fraktionen mit einer Reinheit zwischen 92 und 98 % Monozyten wurden letztendlich in der Zellkultur eingesetzt.

3.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur genaueren Quantifizierung der PBMC und Monozyten wurden diese mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Formel zur Zellzahlbestimmung in Kapitel 3.7.2, Seite 31).

Die Monozytenzahl wurde auf $1,25 \times 10^6$ /ml Zellkulturmedium eingestellt.

3.2.5 Bestimmung des Monozytenanteils in den PBMC

Um den Anteil an Monozyten in den PBMC zu bestimmen, wurden schließlich Zytospin-Präparate mit 150.000 Zellen / Objektträger ($25 \times g$, 1 min) angefertigt und mit 1 ml May-Grünwald-Lösung für drei Minuten gefärbt. Im Lichtmikroskop wurde der prozentuale Anteil der Monozyten an der Gesamtzellzahl durch Auszählen ermittelt.

Die PBMC-Zahl wurde so eingestellt, dass in 1 ml Medium $1,25 \times 10^6$ Monozyten enthalten waren.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Stimulationsansatz der basophilen Granulozyten

Für die Basophilenstimulationstests wurden auf einer Zellkulturplatte (96 Kavitäten, Rundboden) pro Kavität 2.500 Basophile, die zuvor 30 Minuten bei 37°C und 6 % CO_2 vorinkubiert worden waren, in 100 μl Medium mit diversen Stimuli in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Dem Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.3.1.2, Seite 16) wurde IL-3 – ein wichtiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor für basophile Granulozyten [114, 121] – zugesetzt.

Zur Kontrolle wurde zusätzlich jeweils anti-humanes IgE in verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. Der Antikörper aktiviert die Basophilen über Bindung an Fc ϵ RI-gebundenes IgE. Für alle Experimente wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Als unabhängiger Positivtest diente Ionomycin, ein Calcium-Ionophor, das zur höchstmöglichen Freisetzung von IL-4 aus basophilen Granulozyten führt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der lediglich Basophile in Medium ohne IL-3 enthielt.

Nach 24 Stunden Kultur bei 37°C und 6 % CO_2 wurde die gesamte Zellkulturplatte bei -20°C für spätere Analysen eingefroren.

3.3.2 Kokultur von Monozyten/PBMC und Basophilen

Die verschiedenen Kokulturexperimente wurden in einem autologen System durchgeführt, d. h. Monozyten (bzw. PBMC) und basophile Granulozyten in einem Experiment stammten von demselben Spender.

Humane Monozyten (bzw. PBMC) wurden mit einer Monozytenzahl von 250.000 /ml Kulturmedium (siehe Kapitel 2.3.1.2, Seite 16) in Zellkulturplatten

(24 Kavitäten) ausgesät. Die bei den jeweiligen Experimenten angegebenen Stimuli wurden in Kulturmedium verdünnt und nach Möglichkeit im Verhältnis 1:100 zu den Ansätzen gegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde.

Humane basophile Granulozyten wurden vor der Stimulation 30 Minuten (37 °C, 6 % CO₂) vorinkubiert und dann im Verhältnis 1:1 zu den bereits ausgesäten Monozyten und den in das Medium eingebrachten Stimuli gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 1 ml erreicht wurde.

Nach 24 Stunden Kultur bei 37 °C und 6 % CO₂ wurde der Überstand gewonnen und für spätere Analysen bei -20 °C eingefroren (siehe Kapitel 3.4 ELISA, Seite 27).

Bei jedem Experiment wurden folgende Standardansätze mitgeführt:

1. Monozyten in Medium
2. Monozyten und LPS
3. Monozyten, LPS und IL-4
4. Monozyten, LPS und Basophile
5. Monozyten, LPS, Basophile und *E. coli*-IPSE/alpha-1

3.3.3 Kultur von Monozyten

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-4 auf die Differenzierung von Monozyten wurden in einer Zellkulturplatte pro Kavität 250.000 Monozyten in 1 ml Kulturmedium (siehe Kapitel 2.3.1.2, Seite 16), versetzt mit entsprechenden Stimuli, bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

Nach 24 bzw. 48 Stunden Kultur wurden Überstand und Zellen gewonnen. Während der Überstand für spätere Analysen im ELISA (siehe Kapitel 3.4, Seite 27) bei -20 °C gelagert wurde, wurden die Zellen direkt für durchflusszytometrische Analysen (siehe Kapitel 3.5, Seite 28) verwendet.

3.4 ELISA

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zur Quantifizierung, beispielsweise von Zytokinen.

Beim ELISA-Sandwichsystem bindet ein monoklonaler spezifischer Antikörper an eine feste Phase (Boden und Wand der Kavität einer Mikrotiterplatte). Er bildet mit dem zu detektierenden Zytokin einen Immunkomplex, der sich auch durch mehrmaliges Waschen nicht lösen lässt. Es wird dann ein biotinylierter zweiter Antikörper hinzugegeben, an den ein Enzym – bei den verwendeten Tests Streptavidin-Horseradish Peroxidase (Sav-HRP) – gekoppelt ist. Ein farbloses Substrat – hier Tetramethylbenzidin (TMB) – wird durch das Enzym in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt, das nach Abstoppen der Reaktion mittels Schwefelsäure photometrisch bestimmt werden kann. Die Enzymaktivität ist dabei proportional der Konzentration des zu detektierenden Zytokins.

Für die Ermittlung der Zytokinkonzentration in den gewonnenen Zellkulturüberständen wurden die in Tabelle 2.6 auf Seite 19 aufgeführten ELISA-Systeme verwendet.

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers mit den nachfolgend genannten Abweichungen (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2, Seite 28). Die Absorption der entwickelten Platten wurde mit Hilfe eines ELISA Readers (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Guernsey, GB) bei 450 nm gemessen und mit der Software MicroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D) ausgewertet.

3.4.1 IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF

Die Antikörper sowie das Enzymreagenz (Sav-HRP) wurden nicht wie angegeben verdünnt, sondern doppelt so stark. Untersuchungen, die in Teilen bereits im Vorfeld dieser Arbeit von der FG Zelluläre Allergologie durchgeführt worden waren, haben gezeigt, dass die Verdünnung die Messgenauigkeit der Tests nicht beeinträchtigt. Alle anderen Anweisungen des Herstellers wurden befolgt.

Als Substrat diente TMB von tebu-bio (Boechout, B).

3.4.2 IL-4 und IL-13

Zur optimalen Ausnutzung der ELISA-Systeme wurden auch hier leichte Abweichungen vom Herstellerprotokoll etabliert.

Es wurden nur 60 % der Volumina eingesetzt, die der Hersteller für Antikörper, Probe, Standard und Enzymreagenz vorsieht. Geblockt wurde mit 75 % des vorgeschlagenen Volumens. Die Volumina für das Substrat und die Stopplösung wurden beibehalten.

Standards und Proben wurden in Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.3.1.2, Seite 16) verdünnt. Der erste Antikörper wurde in 1x PBS angesetzt. Zum Blocken wurde wie angegeben 1x PBS mit 5 % BSA verwendet. Der zweite Antikörper sowie das Enzymreagenz (Sav-HRP) wurden in 1x PBS mit 1 % BSA angesetzt. Als Substrat diente auch hier TMB von tebu-bio (Boechout, B).

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, häufig auch als Fluorescence-activated cell sorting (FACS) bezeichnet, ermöglicht die Analyse von Zellen auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Dabei werden die zu vermessenden Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und dann sequentiell an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das resultierende Streu- und Fluoreszenzlicht wird von verschiedenen Detektoren (Photomultiplier) aufgefangen, in elektronische Signale umgewandelt und als Messdaten gespeichert. Das Vorwärtsstreu-licht (forward scatter, FSC), d.h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert mit der Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreu-licht (side scatter, SSC), also das im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreute Licht, mit der internen Struktur der Zellen (Granularität und Komplexität) korreliert. Werden die Zellen vor der Analyse auf Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert, geben sie zusätzlich ein charakteristisches Fluoreszenzlicht ab.

Die zu markierenden Zellen wurden in FACS-Puffer (siehe Kapitel 2.3.3.1, Seite 16) aufgenommen. Je 50 μ l Zellsuspension (ca. 50.000 Zellen) wurden pro

Kavität in eine Mikrotiterplatte überführt, mit FACS-Puffer auf 200 µl aufgefüllt und bei 4 °C und 300 x g für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Für die Markierung wurden die Antikörper (siehe Tabelle 2.7, Seite 19) in FACS-Puffer 1:20 verdünnt und mit einem Volumen von 20 µl zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend für die Messung am FACS wieder in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden am LSR II (BD Biosciences, Heidelberg, D) analysiert und die Daten mit Hilfe der Software BD FACSDiva, Version 6.0 (BD Biosciences, Heidelberg, D) ausgewertet.

Für die Berechnung der Kompensation wurden Partikel (BDTM anti-mouse CompBead, BD Biosciences, Heidelberg, D) entsprechend dem Protokoll des Herstellers gefärbt. Die Färbung erfolgte in FACS-Röhrchen unter Verwendung von Färbepuffer (siehe Kapitel 2.3.3.2, Seite 17).

3.6 Histologische Untersuchungen

Formalinfixierte Därme und Lebern von *S. mansoni*-infizierten und nicht infizierten Mäusen wurden freundlicherweise von M. J. Doenhoff (University of Nottingham, Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt.

3.6.1 Organaufbereitung

Die formalinfixierten Lebern und Därme wurden in ca. 0,5 cm³ große Stücke zerschnitten und die erhaltenen Organstücke in einem Gewebeeinbettautomaten (Autotechnikon, Hypercenter XP, SHADON, Pittsburgh, USA) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden sie in einer Paraffingießstation (Leica EG 1140C, LEICA, Nussloch, D) bei 65 °C in flüssiges Paraffin eingebettet. Die abgekühlten Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.6.2 Paraffinschnitte

An einem Rotationsmikrotom (Leica RM2155, LEICA, Nussloch, D) wurden aus den auf Eis weiter gekühlten Paraffinblöcken 3 (Leber) bzw. 5 µm (Darm) dünne Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden in kaltem Wasser schwimmend entfaltet und in einem 39 °C warmen Wasserbad geglättet. Die geglätteten Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht, für mindestens zwei Stunden auf einer Heizplatte bei 37 °C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.6.3 Färbungen

3.6.3.1 Immunhistochemische Färbung von Basophilen via mMCP8

Für die Färbungen wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend kurz in Xylol und Ethanol (1:1) geschwenkt. Mittels Tauchen in Ethanol-Wasser-Lösungen in absteigender Ethanolkonzentration (je zweimal 5 Minuten abs. und 96 % Ethanol sowie je einmal kurz 80 %, 70 % und 40 % Ethanol), an deren Ende die Schnitte in Aqua bidest. verblieben, wurden diese gewässert.

Zum immunhistochemischen Nachweis der Mastzellprotease 8 (MCP8), die in der Maus ausschließlich in basophilen Granulozyten vorkommt [133], wurden die entparaffinierten und gewässerten Schnitte zunächst zur Freilegung maskierter Antigene für 30 Minuten in Citratpuffer (siehe Kapitel 2.3.4.1, Seite 17) in einem Dampfgerät (Tefal, Rumilly, F) gekocht. Für alle weiteren Färbeschritte wurden die ausgekühlten Objektträger in Inkubationskammern (Shandon SequenzaTM; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D) eingespannt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (siehe Kapitel 2.3.4.3, Seite 17) wurden die Schnitte 20 Minuten mit Blockierungspuffer (siehe Kapitel 2.3.4.5, Seite 17) blockiert und über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Ratte anti-Maus MCP8 1:500 in Blockierungspuffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (anti-Ratte IgG AF633 1:1.000 in Färbepuffer (siehe Kapitel 2.3.4.4, Seite 17)) zusammen mit DAPI (ebenfalls 1:1.000 in Färbepuffer) für eine Stunde aufgetragen wurde. DAPI ist Fluoreszenzfarbstoff, der Desoxyribonukleinsäure (DNS) markiert und so Zellkerne sichtbar macht. Auch deren Überschuss wurde durch dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS-Tween entfernt. Jeder Objektträger wurde mit Prolong Gold[®] eingebettet und im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Kontrolle wurden jeweils Schnitte nur mit dem Sekundärantikörper und DAPI, allein mit DAPI oder nicht gefärbt; ansonsten aber analog behandelt.

Die histologischen Präparate wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop von Olympus (Olympus IX-81; Olympus, Tokio, J) begutachtet. Die Photodokumentation erfolgte mit dem Programm cell[^]P FIVE, Version 3.4 (Olympus, Tokio, J) für Microsoft Windows NT.

3.6.3.2 Immunhistochemische Färbung von IPSE/ α -1

Wie bereits oben für die Färbung der basophilen Granulozyten beschrieben (siehe Kapitel 3.6.3.1, Seite 29), wurden die Gewebeschnitte zunächst in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und gewässert. Anschließend wurden die Epitope durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer demaskiert.

Der immunhistochemische Nachweis von IPSE/ α -1 erfolgte analog zu dem in Kapitel 3.6.3.1, Seite 29 dargestellten immunhistochemischen Nachweis von mMCP8. Als primärer Antikörper wurde hier Maus anti-His-IPSE/ α -1 (monoklonal, Klon 744B7) 1:100 verdünnt eingesetzt. Weiter wurde der sekundäre Antikörper (anti-Maus IgG AF488) 1:200 verdünnt und DAPI zur Darstellung der Zellkerne wiederum 1:1.000. Die gefärbten Objekte wurden wieder mit Prolong Gold[®] eingebettet und im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet.

Als Kontrolle dienten auch hier ohne Primärantikörper gefärbte bzw. ungefärbte Schnitte, die am inversen Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-81 (Olympus, Tokio, J) begutachtet und mit dem Programm cell[^]P FIVE, Version 3.4 (Olympus, Tokio, J) für Microsoft Windows NT dokumentiert wurden.

3.6.3.3 Zytochemischer Nachweis von Mastzellen

Die Färbung der Mastzellen wurde von Gesine Rode (Zane Orinska, ehemalige FG Immunbiologie) durchgeführt.

Das Prinzip basiert auf dem Nachweis der in den Mastzellgranula enthaltenen Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase. Verwendung fand entsprechend den

Angaben des Herstellers das Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-System von Sigma-Aldrich (Verfahren Nr. 90).

Die entparaffinierten Präparate werden hierzu mit Naphthol AS-D Chloracetat in Gegenwart eines stabilen Diazoniumsalzes inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse von Esterverbindungen setzt Naphtholverbindungen frei, welche sich mit dem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff verbinden. An den Enzymaktivitätsstellen bilden sich so im Zytoplasma Ablagerungen mit intensiver rotvioletter Färbung. Mit saurer Hämatoxylin-Lösung werden anschließend die Zellkerne blau gegengefärbt.

3.7 Formeln

3.7.1 Zentrifugation

Folgende Formel beschreibt den Zusammenhang zwischen Umdrehungszahl und Zentrifugalkraft:

$$rpm = \sqrt{\frac{RCF}{11,18 \times r}} \times 1.000$$

| | |
|------------|--|
| <i>rpm</i> | Umdrehungszahl in U/min |
| <i>RCF</i> | relative Zentrifugalkraft in Vielfachen der Erdbeschleunigung ($\times g$) |
| <i>r</i> | Radius in cm |

3.7.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Aus den in der Neubauer-Zählkammer ausgezählten Zellen kann nach folgender Formel die Konzentration der Zellsuspensionen berechnet werden:

$$c = \frac{n}{A \times h} \times V_{Faktor} \times 10^3$$

| | |
|---------------------------|---|
| <i>c</i> | Zellzahl / ml |
| <i>n</i> | Mittelwert der Zellzahlen aus vier ausgezählten Großquadraten |
| <i>A</i> | Fläche eines Großquadrates in mm ² |
| <i>h</i> | Kammertiefe in mm |
| <i>V_{Faktor}</i> | Faktor der Verdünnung |

Hieraus kann die Gesamtzellzahl bei bekannten Volumen ermittelt werden:

$$x = c \times V$$

| | |
|----------|----------------|
| <i>x</i> | Gesamtzellzahl |
| <i>c</i> | Zellzahl /ml |
| <i>V</i> | Volumen in ml |

3.8 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind Einzeldaten oder Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt ($n \geq 3$).

Die Freisetzung der Interleukine IL-1 β , IL-6 und TNF sowie IL-10 in den Standardansätzen der Kokultur mit Monozyten bzw. PBMC wurde normalisiert. Dazu wurden in den Zellkulturüberständen gemessene monozytäre Zytokinkonzentrationen in Relation zur Zytokinkonzentration nach LPS-Stimulation der Monozyten bzw. PBMC (entspricht 100 %) gesetzt. Für die von basophilen Granulozyten freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 wurde der Ansatz der maximalen Interleukinfreisetzung (Ansatz 5: Monozyten, LPS, Basophile und *E. coli*-IPSE) als Bezugspunkt der Normalisierung gewählt.

Für die Ermittlung der Signifikanzen wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene (gepaarte) Stichproben auf die normalisierten Daten angewandt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Prism 6, Version 6.0f (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) für Mac OS X durchgeführt.

Dabei gilt:

- $p > 0,05$ (ns) nicht statistisch signifikant
- $p \leq 0,05$ (*) statistisch signifikant
- $p \leq 0,005$ (**) statistisch hoch signifikant
- $p \leq 0,001$ (***) statistisch höchst signifikant

Kapitel 4

Ergebnisse

Das von den Eiern von *S. mansoni* sekretierte IPSE/alpha-1 ist ein Immunglobulin-bindender Faktor, der basophile Granulozyten über die Bindung an FcεRI-gebundenes IgE aktiviert. Humane Basophile degranulieren bereits nach Kontakt mit geringen Mengen IPSE/alpha-1 unter Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 [108]. Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) konnte ich zeigen, dass die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 aus LPS-stimulierten Monozyten durch Kokultur mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen gehemmt wird. In Gegenwart eines neutralisierenden anti-humanen IL-4 Antikörpers ließ sich diese Inhibierung der monozytären Zytokinausschüttung aufheben.

In den folgenden Kapiteln wird dargestellt, dass basophile Granulozyten im Mausegewebe zweifelsohne in den Granulomen um *S. mansoni*-Eier nachgewiesen werden können und somit IPSE/alpha-1 unmittelbar auf die Basophilen wirken könnte. Neben IPSE/alpha-1 beeinflussen auch TLR-Agonisten aus dem Wirtsorganismus und dessen Mikrobiom die basophilen Granulozyten in einem höchst inflammatorischen Umfeld und erhöhen die Freisetzung von antiinflammatorisch wirksamem IL-4 aus Basophilen. Dabei handelt es sich um keinen universellen Mechanismus unabhängig vom TLR-Agonisten. Ferner wird der Mechanismus der *in vitro*-Inhibierung der monozytären Zytokinausschüttung im humanen System eingehender beschrieben und der Phänotyp der mit Basophilen kokultivierten Monozyten charakterisiert. Abschließend kann gezeigt werden, dass auch in einem komplexeren Kokultursystem aus basophilen Granulozyten und PBMC der inhibierende Effekt von IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reproduzierbar ist.

4.1 Basophile in Granulomen um *S. mansoni*-Eier in Darm und Leber infizierter Mäuse

Bereits in den 70er Jahren wurde begonnen, die am granulomatösen Entzündungsgeschehen um *S. mansoni*-Eier beteiligten Immunzellen zu charakterisieren (siehe Kapitel 1.4.1, Seite 5). Basophile waren zu Beginn dieser Arbeit in Granulomen um *S. mansoni*-Eier jedoch noch nicht beschrieben. Da kein humanes Gewebe für die Analyse der *in vivo*-Situation im *S. mansoni*-Eigranulom zur

Verfügung stand, wurden die folgenden histologischen Untersuchungen an Mausgeweben durchgeführt, die uns freundlicherweise von M. J. Doenhoff (University of Nottingham, Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt wurden.

4.1.1 Der Nachweis von basophilen Granulozyten im Granulom um *S. mansoni*-Eier

An Paraffinschnitten von Leber und Darm von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen und nicht infizierten Kontrollmäusen wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss über die Lokalisation von basophilen Granulozyten im *S. mansoni*-Eigranulom geben sollten. Die Basophilen wurden mittels eines unkonjugierten spezifischen, gegen die Maus-Mastzellprotease 8 (mMCP8) gerichteten Antikörpers markiert, welcher seinerseits durch Bindung eines sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers visualisiert wurde (siehe Kapitel 3.6.3.1, Seite 29). mMCP8 wird ausschließlich in Mausbasophilen und nicht, wie der Name vermuten lässt, in Mastzellen exprimiert. Zur besseren Darstellung der konzentrisch aufgebauten Eigranulome in den Geweben der infizierten Mäuse wurden in allen Gewebeschnitten die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert.

Abbildung 4.1 auf Seite 35 zeigt in 100facher Vergrößerung Leber- und Darmgewebe von mit *S. mansoni* infizierten sowie nicht infizierten Mäusen. Gut zu erkennen im Zentrum der Granulome sind die Schistosomen-Eier mit ihrem charakteristischen lateralen Stachel; die autofluoreszierende Eihülle strahlt bei Anregung mit blauem Licht grünes Licht ab. Basophile Granulozyten (rote Fluoreszenz) konnten ausschließlich in Leber und Darm von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen nachgewiesen werden, nicht jedoch in nicht infizierten Kontrollgeweben.

Sowohl in der Leber als auch im Darm waren die basophilen Granulozyten fast ausschließlich in den Granulomen lokalisiert. Bemerkenswert ist ferner, dass in fast allen Granulomen im Darm mehrere Eier eingeschlossen waren, wohingegen die Lebergranulome selten mehr als ein Ei enthielten. Zusätzlich zu diesem Befund ist die Darmwand infizierter Mäuse deutlich dicker als die der gesunden Kontrollmäuse.

4.1.2 Der Nachweis von Basophilen und IPSE/alpha-1 im Granulom um *S. mansoni*-Eier

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass basophile Granulozyten in das Granulom um *S. mansoni*-Eier rekrutiert werden, stellte sich die Frage, ob im Granulom eine Interaktion zwischen Basophilen und dem von *S. mansoni*-Eiern sezernierten, Basophile aktivierenden Faktor IPSE/alpha-1 beobachtet werden kann. Aufschluss hierüber sollte die simultane Darstellung von Basophilen und IPSE/alpha-1 im infizierten Mausgewebe geben.

Die basophilen Granulozyten in den Präparaten wurden wiederum mit dem Antikörper gegen mMCP8 markiert. Zusätzlich wurde ein gegen IPSE/alpha-1 gerichteter monoklonaler Antikörper (anti-His-IPSE/alpha-1), an den ebenfalls ein sekundärer fluoreszenzmarkierter Antikörper gebunden wurde, eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.3.2, Seite 30), um die Lokalisation von IPSE/alpha-1 im Granulom aufzuzeigen. Die Zellkerne wurden auch hier mit DAPI gefärbt.

Abbildung 4.2 auf Seite 36 zeigt in 100facher Vergrößerung Leber- und Darmgewebe von mit *S. mansoni* infizierten und nicht infizierten Mäusen. Zusätzlich

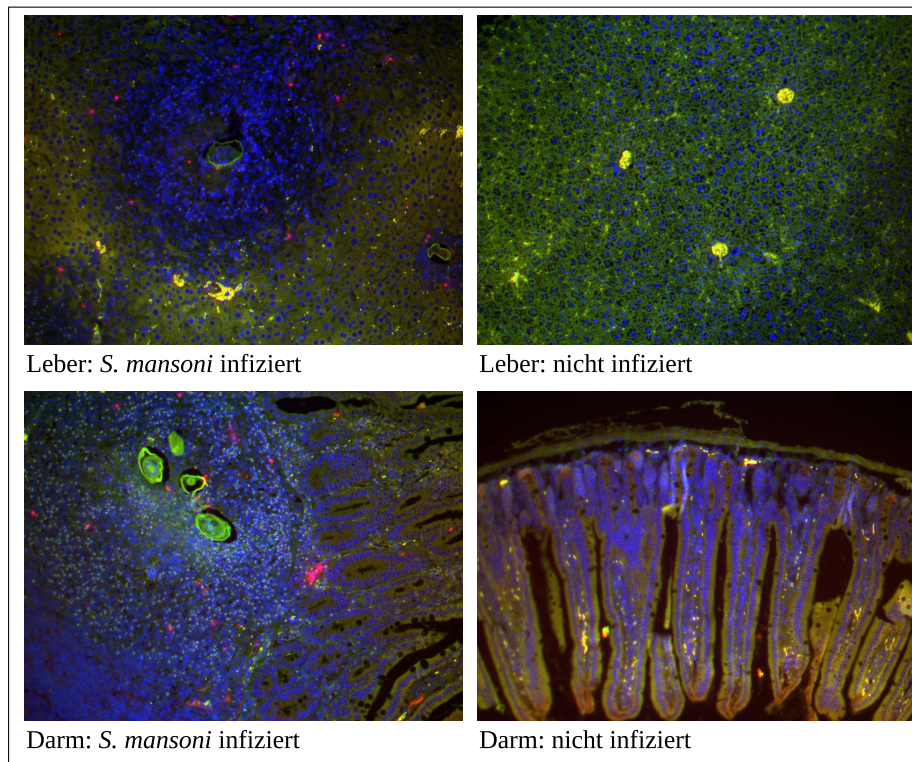
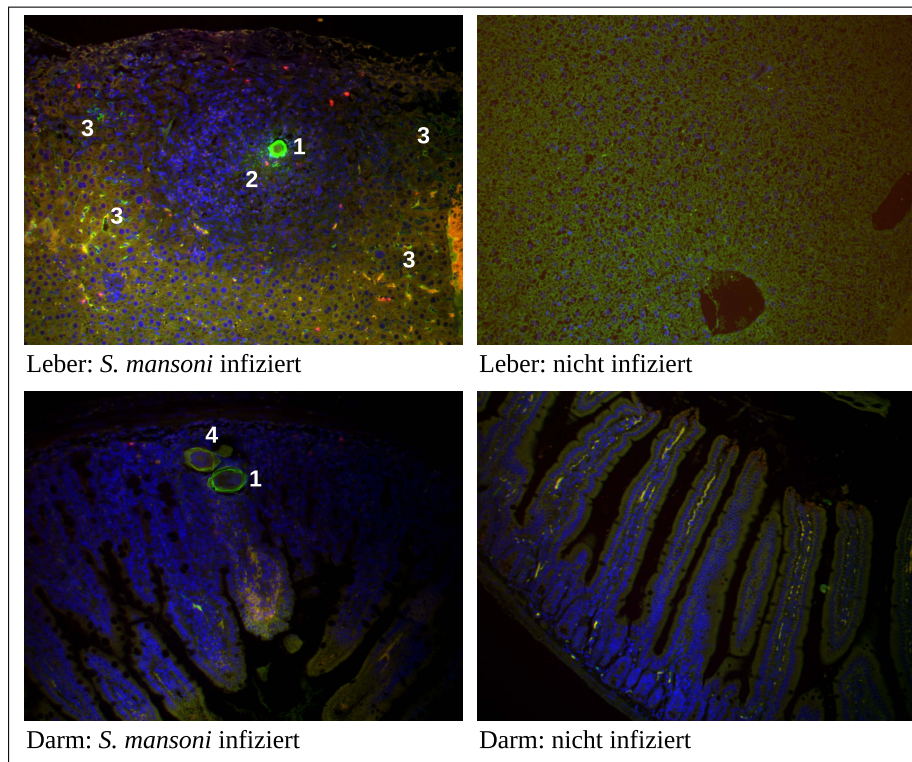


Abbildung 4.1: Infiltration von Basophilen in *S. mansoni*-Eigranulome infizierter Mäuse: Leber- und Darmschnitte von mit *S. mansoni* infizierten sowie nicht infizierten Mäusen; rot: Basophile (Primärantikörper: Ratte anti-mMCP8 1:500, Sekundärantikörper: anti-Ratte IgG AF633 1:1.000), grün: Eihülle (Autofluoreszenz), blau: Zellkerne (DAPI 1:1.000); 100fach vergrößert

zu den Basophilen (rote Fluoreszenz) ist auch IPSE/alpha-1 (grüne Fluoreszenz) markiert, das im Bereich der Eihülle deren Autofluoreszenz überdeckt (1). Ausgehend von der Eihülle diffundiert IPSE/alpha-1 in das Granulom (2). Konzentrationsunterschiede sind dabei anhand der Fluoreszenzintensität nicht erkennbar. Teils wurde IPSE/alpha-1 von Immunzellen am Rande des Granuloms aufgenommen (3), jedoch nicht von Basophilen. Zusätzlich ist anzumerken, dass nicht in allen Granulomen bzw. Eiern IPSE/alpha-1 nachgewiesen werden konnte (4). Vermutlich kann diese Beobachtung auf das unterschiedliche Alter der Eier bzw. der Granulome und damit einhergehend auf differentielle Protein-Expressionsmuster zurückgeführt werden: Die Eier werden von *S. mansoni* unreif abgelegt. Bei ihrer Wanderung durch die Gewebe reifen in ihnen innerhalb von zehn Tagen die Mirazidien heran. In Granulomen eingeschlossene Eier sterben schließlich ab und verkalken. Interessanterweise wurden Basophile trotz Abwesenheit von IPSE/alpha-1 in einigen Granulomen in diesen detektiert, was darauf hinweist, dass IPSE/alpha-1 selbst nicht an der Rekrutierung der Basophilen beteiligt ist. Ferner konnten zwar in den meisten, jedoch nicht in allen Granulomen basophile Granulozyten markiert werden, was möglicherweise eine



Abbildungung 4.2: Lokalisation von IPSE/alpha-1 und Basophilen im *S. mansoni*-Eigranulom infizierter Mäuse: Leber- und Darmschnitte von mit *S. mansoni* infizierten sowie nicht infizierten Mäusen; blau: Zellkerne (DAPI 1:1.000), rot: Basophile (Primärantikörper: Ratte anti-mMCP8 1:500, Sekundärantikörper: anti-Ratte IgG AF633 1:1.000), grün: Eihülle (Autofluoreszenz **4**) und IPSE/alpha-1 (Primärantikörper: Maus anti-IPSE/alpha-1 1:100, Sekundärantikörper anti-Maus IgG AF488 1:200) **1** unter der Eihülle, **2** in das Granulom diffundierend, **3** von Immunzellen aufgenommen; 100fach vergrößert

Folge des vorangegangenen Kontaktes der Basophilen mit IPSE/alpha-1 und ihrer dadurch ausgelösten Degranulation ist.

4.1.3 Die Lokalisation von Mastzellen in Mausgeweben

Basophile und Mastzellen weisen morphologisch und funktionell viele Gemeinsamkeiten auf und entwickeln sich vermutlich aus den gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark. Um sicherzustellen, dass mit dem gegen mMCP8 gerichteten Antikörper zweifelsfrei nur basophile Granulozyten angefärbt worden waren, wurden in Paraffinschnitten von Leber und Darm *S. mansoni*-infizierter Mäuse sowie gesunder Kontrollmäuse Mastzellen basierend auf dem zytochemischen Nachweis der Naphthol-AS-D Chloracetat-Esterase gefärbt (siehe Kapitel 3.6.3.3, Seite 30).

In Abbildung 4.3 auf Seite 37 sind – wie zu erwarten – sowohl im Darm der mit *S. mansoni* infizierten als auch der gesunden Mäuse viele rot gefärbte

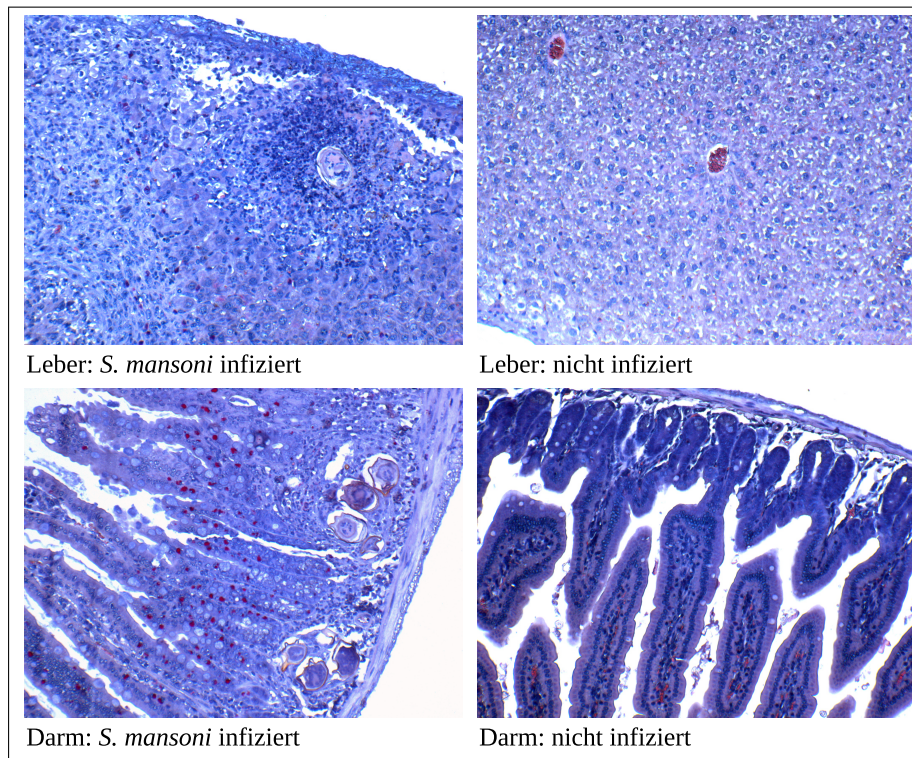


Abbildung 4.3: Lokalisation von Mastzellen in Leber und Darm von mit *S. mansoni* infizierten sowie nicht infizierten Mäusen: zytochemischer Nachweis der Naphthol-AS-D Chloracetat-Esterase in Mastzellen (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (blau); 100fach vergrößert [mit freundlicher Unterstützung durch Zane Orinska]

Mastzellen zu erkennen. Diese sind jedoch auch bei den infizierten Mäusen gleichmäßig über den gesamten Darm verteilt und nicht wie die basophilen Granulozyten (siehe Abbildungen 4.1 und 4.2, Seite 35 bzw. 36) ausschließlich im Granulom lokalisiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von mMCP8-positiven Zellen und Mastzellen im Darm von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen sowie der Tatsache, dass im Darm gesunder Mäuse zwar Mastzellen jedoch keine mMCP8-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass mit dem anti-mMCP8 Antikörper in der Tat spezifisch basophile Granulozyten im Granulom um *S. mansoni*-Eier erfasst wurden.

4.2 Der Einfluss von TLR-4 Agonisten auf die durch IPSE/alpha-1 induzierte IL-4 Freisetzung aus Basophilen

Die vorangegangenen histologischen Untersuchungen konnten eindeutig belegen, dass basophile Granulozyten *in vivo* in Granulome um *S. mansoni*-Eier

einwandern. In den Granulomen treffen die Basophilen auf IPSE/alpha-1 aus den Schistosomen-Eiern, welches die Basophilen zur Freisetzung von IL-4, einem Zytokin mit antiinflammatorischen Potential, veranlasst.

Alle weiteren Daten wurden in *in vitro*-Experimenten erhoben, da die Wirkung von IPSE/alpha-1 auf basophile Granulozyten unter Einbeziehung anderer immunkompetenter Zellen und deren Interaktionen im Gewebe nur schwer zu untersuchen sind. Der Wechsel zum *in vitro*-System ermöglichte es zudem, mit humanen Zellen weiterzuarbeiten und die Rolle von basophilem IL-4 im Entzündungsgeschehen eingehender zu analysieren.

4.2.1 LPS

Wenn die Eier von *S. mansoni* aus den Mesenterialvenen – gefördert durch die Granulombildung – durch die Darmwand in das Darmlumen wandern, kommen sie und rekrutierte basophile Granulozyten gewiss in Kontakt mit dem Mikrobiom des Darms und damit mit LPS, einem wesentlichen Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien.

Basophile Granulozyten exprimieren sogenannte Toll-like Rezeptoren, u. a. auch TLR4, der durch LPS aktiviert wird. Erstaunlicherweise lassen sich Basophile jedoch durch LPS kaum aktivieren (Daten nicht abgebildet). Die gleichzeitige Stimulation mit LPS (via TLR4) und IPSE/alpha-1 (via FcεRI) führt hingegen zu einer synergistischen Erhöhung der IPSE/alpha-1-induzierten IL-4 Freisetzung aus Basophilen, wie ich bereits in meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) zeigen konnte.

4.2.2 HMG-1

Die Frage stellte sich, ob weitere TLR-Agonisten ebenfalls fähig sind, die durch IPSE/alpha-1 induzierte IL-4 Freisetzung aus basophilen Granulozyten zu erhöhen und ob dem ein allgemeines Prinzip zugrunde liegt.

Ausgelöst durch die Wanderung der Schistosomen-Eier aus den Mesenterialvenen durch die Darmwand in das Darmlumen und die damit einhergehende Granulombildung führen Entzündungsprozesse weiter zum Untergang von Zellen. Nekrotische Zellen setzen Amphoterin (auch High-mobility group protein B1 oder kurz HMG-1 genannt) frei, das eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielt. Für HMG-1 wurde beschrieben, dass es wie LPS mit einer Vielzahl an TLR, u. a. TLR2 und TLR4, interagiert [94].

Um den Einfluss der beiden genannten TLR-Liganden auf die IL-4 Freisetzung aus Basophilen zu bestimmen, wurden gereinigte humane basophile Granulozyten in Gegenwart von IL-3 – einem wichtigen Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Basophile [114, 121] – über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen an HMG-1 respektive *E. coli*-IPSE/alpha-1 in Ab- und Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) bzw. HMG-1 (10 und 100 ng/ml) inkubiert und die IL-4 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Die Menge an sezerniertem IL-4 aus basophilen Granulozyten ist dabei abhängig von der zur Stimulation eingesetzten Konzentration an IPSE/alpha-1 und zeigt einen glockenförmigen Verlauf (siehe Abbildung 4.4, Seite 39). Das Maximum der IL-4 Freisetzung liegt jeweils in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 und < 500 ng IPSE/alpha-1 je ml.

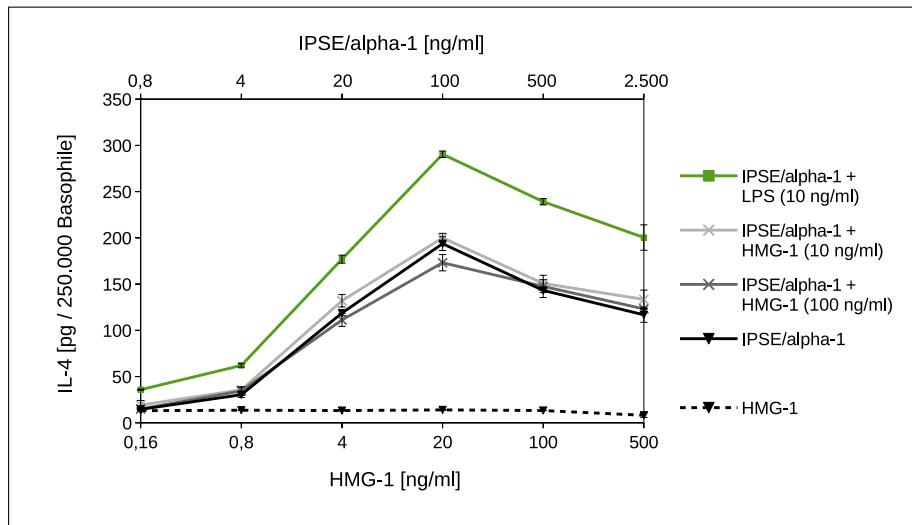


Abbildung 4.4: Dosisabhängige IL-4 Produktion nach Stimulation humaner Basophiler mit HMG-1 allein oder *E. coli*-IPSE/alpha-1 allein und in Gegenwart von LPS [10 ng/ml] sowie in Gegenwart von HMG-1 [10 ng/ml und 100 ng/ml], Dauer: 16 h (n = 3)

HMG-1 allein in verschiedenen Konzentrationen führt – wie auch für LPS beobachtet – zu keiner nennenswerten Freisetzung von IL-4 aus Basophilen (schwarz gestrichelte Kurve).

Wie bereits beschrieben, ist die Konzentration an im Zellkulturüberstand detektiertem IL-4 nach Stimulation der Basophilen mit *E. coli*-IPSE/alpha-1 und LPS (grüne Kurve) deutlich höher als die nach Stimulation der Basophilen mit *E. coli*-IPSE/alpha-1 allein (schwarze Kurve). Im Gegensatz dazu führte die zusätzliche Gabe von HMG-1 zu *E. coli*-IPSE/alpha-1 (graue Kurven) zu keiner Erhöhung der IL-4 Freisetzung aus basophilen Granulozyten.

Untersuchungen mit anderen TLR-Liganden bei gleichzeitiger Stimulation von FcεRI auf Basophilen wurden bereits in der Forschungsgruppe durchgeführt und zeigten ähnliche ligandenabhängige Effekte [Schramm, G. persönliche Mitteilung].

4.3 Mechanismus der durch IPSE/alpha-1 über Basophile vermittelten Antiinflammation

Im Zuge einer Infektion mit *S. mansoni* werden also erwiesenermaßen basophile Granulozyten in Granulome, die durch die Eier des Parasiten induziert werden, rekrutiert, wo sie auf IPSE/alpha-1, das von diesen sekretiert wird, und TLR-Agonisten treffen. Infolgedessen sezernieren die Basophilen in einem höchst inflammatorischen Umfeld IL-4. IL-4 inhibiert *in vitro* die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten Monozyten.

Die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen, ob hierfür ein direkter Kontakt zwischen basophilen Granulozyten und Monozyten notwendig ist, auf wel-

chen Stimulus hin die Basophilen rekrutiert werden und ob sie unmittelbar die Monozyten beeinflussen, werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.3.1 Das notwendige Verhältnis von Basophilen zu Monozyten bei der Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Monozyten, vermittelt durch IPSE/alpha-1 *in vitro*

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, in welchem zahlenmäßigen Verhältnis Basophile und Monozyten in den folgenden Kokultorexperimenten eingesetzt werden sollten, um Effekte des von den IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen freigesetzten IL-4 auf die LPS-stimulierten Monozyten beobachten zu können.

Ein Mikroliter Blut enthält ca. 10 bis 100 basophile Granulozyten und 200 bis 1.000 Monozyten, was in etwa einem Verhältnis von 1:10 entspricht. Ob dieses Verhältnis auch für den Ort einer Entzündung oder die durch das Eistadium von *S. mansoni* induzierten Granulome gilt, ist nicht bekannt.

Humane Monozyten (250.000 /ml) wurden mit verschiedenen Stimuli, u. a. basophilen Granulozyten desselben Spenders in verschiedenen Verhältnissen, für 24 Stunden kultiviert und die Zytokinkonzentrationen von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. In den dazugehörigen Abbildungen (Abbildung 4.5, Seite 40 und Abbildung 4.6, Seite 41) sind repräsentativ jeweils die Daten von einem gesunden Spender dargestellt.

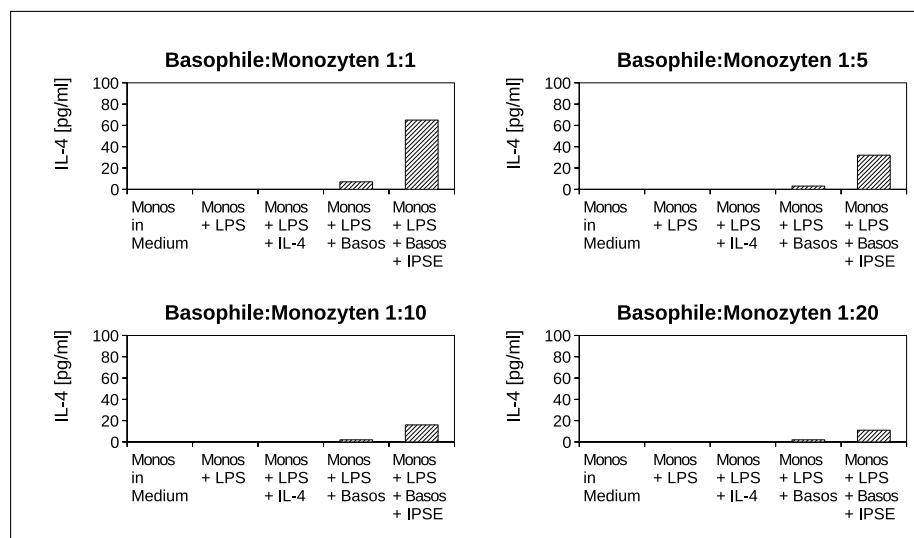


Abbildung 4.5: Die IL-4 Freisetzung aus humanen Basophilen in der Kokultur mit Monozyten bei verschiedenen Verhältnissen von Basophilen zu Monozyten. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml, Basophile: 250.000, 50.000, 25.000, 12.500 /ml)

Lediglich in den Ansätzen mit 250.000 Basophilen, entsprechend einem Verhältnis von Basophilen zu Monozyten von 1:1, konnten größere Mengen an IL-4

detektiert werden – maximal 65 pg/ml; dabei war die ermittelte IL-4 Konzentration stets proportional der Zahl der eingesetzten basophilen Granulozyten (siehe Abbildung 4.5, Seite 40). 65 pg/ml entspricht nicht ganz der Menge an rekombinantem humanen IL-4, die standardmäßig in der Positivkontrolle eingesetzt wird (120 pg/ml) und die die Freisetzung von IL-6 aus LPS-stimulierten Monozyten sichtbar und zuverlässig inhibiert. Hierbei ist anzumerken, dass exogen zugeführtes rekombinantes IL-4 nicht durch das IL-4 ELISA-System (EliPair von Diaclone) zu detektieren war. Leider wurden in keinem der insgesamt fünf durchgeführten Versuche, deren Zellen aus dem Blut verschiedener Spender gewonnen worden waren, mehr als 65 pg/ml IL-4 aus den Basophilen freigesetzt.

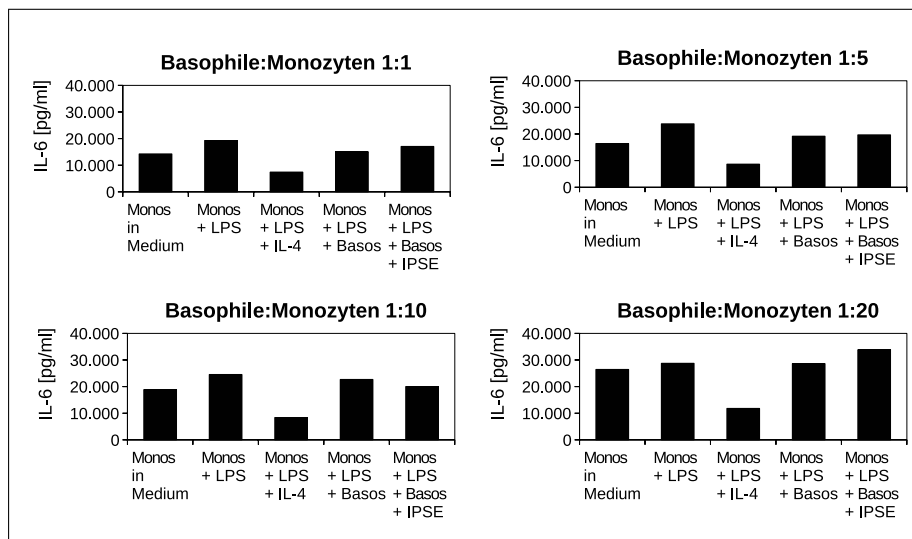


Abbildung 4.6: Die Beeinflussung der IL-6 Freisetzung aus LPS-stimulierten humanen Monozyten in der Kokultur bei verschiedenen Verhältnissen von Basophilen zu Monozyten. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/ α -1 100 ng/ml, Basophile: 250.000, 50.000, 25.000, 12.500 /ml)

Auffällig ist auch, dass bereits im Medium kultivierte Monozyten reichlich IL-6 in das Medium abgegeben haben und die Zugabe von LPS nur zu einer leichten weiteren Erhöhung der IL-6 Spiegel führte (siehe Abbildung 4.6, Seite 41). Diese Aktivierung zu klären, hätte weiterer Versuche bedurft, auf die in diesem Fall in Anbetracht der Erkenntnis, dass für eine sichtbare Inhibierung der Zytokinfreisetzung aus Monozyten ein gewisses Mindestmaß an IL-4 vorhanden sein muss, verzichtet wurde.

Reagieren die Basophilen eines Spenders nach Stimulation mit LPS und IPSE/ α -1 besonders gut und sezernieren IL-4 in hohen Konzentrationen, kann auch u. U. ein Basophilen-Monozyten-Verhältnis von 1:5 oder 1:10 noch einen Hemmeffekt auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung aus Monozyten zeigen, während in anderen Fällen – wie in dem exemplarisch dargestellten – selbst bei einem Verhältnis von 1:1 nur eine geringe Hemmung zu beobachten ist. Es ist auch denkbar, dass Basophile an den Ort einer Entzündung in

so großer Zahl rekrutiert werden, dass sich das Verhältnis von Basophilen zu Monozyten, wie es im Blut vorliegt, zugunsten der Basophilen verschiebt oder aber dass die Basophilen sich in so großer räumlicher Nähe zu den Monozyten befinden, dass bereits kleinere Dosen an IL-4, einzelne Monozyten in ihrer Zytokinfreisetzung beeinflussen. In allen folgenden Untersuchungen wurden daher weiterhin Basophile in einem Verhältnis von 1:1 mit Monozyten kokultiviert, um im *in vitro*-System eindeutige Effekte beobachten zu können.

4.3.2 Die Rolle von basophilem IL-13 in der Inhibierung der Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten *in vitro*

Bis hierhin war der Fokus bei der Untersuchung der immunmodulatorischen Funktion von IPSE/alpha-1 gerichtet auf die Bestimmung der IL-4 Freisetzung aus Basophilen und der Analyse dessen Wirkung. Neben IL-4 sezernieren basophile Granulozyten jedoch auch IL-13 als Reaktion auf die Stimulation mit IPSE/alpha-1. Für IL-13 ist genau wie für IL-4 eine inhibierende Wirkung auf die proinflammatorische Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten beschrieben. Daher sollte die Rolle von IL-13 bei der *in vitro*-Hemmung von Monozyten nach Stimulation mit LPS untersucht werden. Als Indikatorzytokin fungierte hierbei das proinflammatorische Zytokin IL-6, welches exemplarisch als von Monozyten freigesetztes Zytokin detektiert wurde.

Es wurden frisch isolierte humane Monozyten in Medium sowie in Gegenwart von LPS (10 ng/ml) und rekombinantem humanen IL-13 in verschiedenen Konzentrationen jeweils in An- und Abwesenheit eines neutralisierenden anti-humanen IL-13 Antikörpers für 24 Stunden kultiviert. In den gewonnenen Zellkulturüberständen wurden die Konzentrationen an freigesetztem IL-6 mittels ELISA bestimmt.

Erst hohe Konzentrationen an IL-13 ($\geq 1,2$ ng/ml) vermögen die LPS-induzierte IL-6 Freisetzung aus Monozyten zu hemmen (siehe Abbildung 4.7 A, schwarze Balken auf Seite 43). Diese inhibierende Wirkung wird durch Zugabe des neutralisierenden anti-humanen IL-13 Antikörpers (siehe Abbildung 4.7 B, graue Balken auf Seite 43) aufgehoben. Dabei reichte die Menge des eingesetzten Antikörpers nicht aus, um auch die Wirkung sehr hoher IL-13 Konzentrationen (≥ 12 ng/ml) vollständig zu neutralisieren.

Mit Kenntnis des Wirkungsbereiches des anti-humanen IL-13 Antikörpers wurde dieser nachfolgend auch in der Kokultur LPS-stimulierter Monozyten mit IPSE/alpha-1-aktivierten Basophilen eingesetzt. Humane Monozyten und basophile Granulozyten desselben Donors wurden in Gegenwart verschiedener Stimuli (LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml sowie *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml) kokultiviert. Dabei wurde je eine Versuchsreihe ohne neutralisierenden Antikörper, eine mit anti-IL-4 und eine mit anti-IL-13 Antikörper angesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und in ihnen die Konzentrationen von IL-6 sowie IL-4 und IL-13 mittels ELISA bestimmt. Zu beachten ist dabei, dass neutralisiertes basophiles IL-4 ebenso wie exogen zugeführtes rekombinantes IL-4 nicht durch das IL-4 ELISA-System (EliPair Diaclone) nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu jedoch war die Detektion von neutralisiertem basophilen IL-13 mittels IL-13 ELISA-System (EliPair Diaclone) möglich.

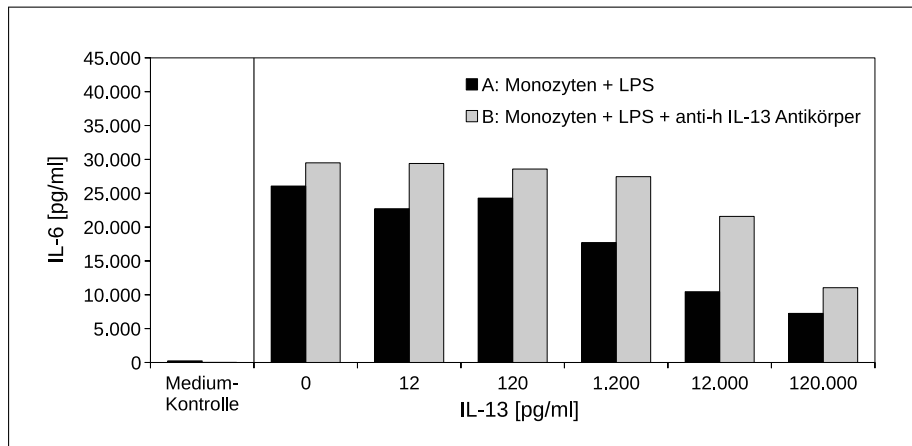


Abbildung 4.7: Die Hemmung der IL-6 Freisetzung aus LPS-stimulierten humanen Monozyten durch IL-13 wird durch Antikörper gegen IL-13 aufgehoben. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten. (Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, anti-h IL-13 Antikörper 10 µg/ml)

Bei Neutralisation des durch basophile Granulozyten nach Stimulation mit LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 sezerniertem IL-13 bleibt die Inhibition der IL-6 Ausschüttung aus LPS-stimulierten Monozyten erhalten, während sie bei Neutralisation von IL-4 aufgehoben ist (siehe Abbildung 4.8, Seite 44). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass aus Basophilen in der *in vitro*-Kultur nur etwa ein Zehntel der Menge an rekombinanten IL-13 freigesetzt wird, der es bedarf, um die Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten zu hemmen. Die *in vitro*-Hemmung ist damit abhängig von basophilem IL-4, aber nicht von basophilem IL-13. Folglich wird zur Analyse der immunmodulatorischen Funktion von IPSE/alpha-1 im Rahmen der Doktorarbeit basophiles IL-4 bestimmt und in Kontrollen rekombinantes humanes IL-4 eingesetzt.

4.3.3 Vergleich der biologischen Aktivität von natürlichem und rekombinantem IPSE/alpha-1 in der Kokultur

Für die *in vitro*-Untersuchungen standen verschiedene IPSE/alpha-1 Präparationen zur Verfügung:

- natürliches IPSE/alpha-1 (nIPSE)
- IPSE/alpha-1, exprimiert in *E. coli* (*E. coli*-IPSE), nicht glykosyliert
- IPSE/alpha-1, exprimiert in HEK-Zellen (HEK-IPSE).

Natürliches IPSE/alpha-1 kann aus dem Extrakt von *S. mansoni*-Eiern nur in geringen Mengen isoliert werden, während rekombinantes IPSE/alpha-1 in ausreichender Menge verfügbar ist.

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) konnte ich zeigen, dass alle Präparationen von IPSE/alpha-1

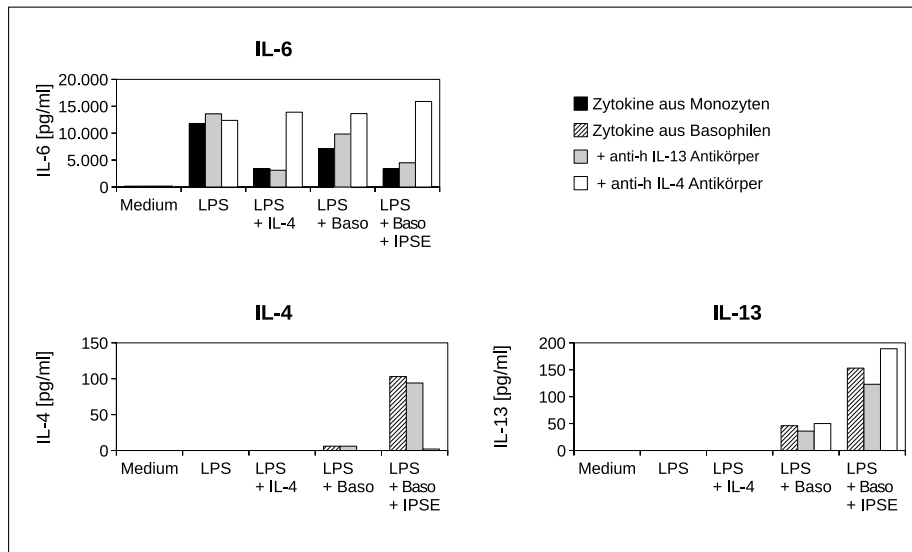


Abbildung 4.8: Der Einfluss von IL-4 und IL-13 aus Basophilen auf die Freisetzung von IL-6 aus humanen Monozyten in der Kokultur.
(n = 1; Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml sowie anti-h IL-4 Antikörper 1 µg/ml und anti-h IL-13 Antikörper 10 µg/ml)

eine ähnlich hohe Ausschüttung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten induzieren und funktionell aktiv sind. Ob und inwiefern die verschiedenen IPSE/alpha-1 Präparationen die Monozyten in der Kokultur beeinflussen, war bis hierhin nicht bekannt.

Um die biologische Aktivität der verschiedenen IPSE/alpha-1 Präparationen zu vergleichen, wurden isolierte humane Monozyten (250.000 /ml) für 24 Stunden in Gegenwart von LPS (10 ng/ml), IL-4 (0,12 ng/ml), *E. coli*- bzw. natürlichem oder HEK-IPSE (100 ng/ml) und Basophilen (250.000 /ml) desselben Spenders kultiviert. Von allen Ansätzen wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und im ELISA die Zytokine IL-4 (exemplarisch als aus Basophilen freigesetztes Zytokin) und IL-6 (exemplarisch als aus Monozyten freigesetztes Zytokin) bestimmt. Exogen zugeführtes rekombinantes IL-4 konnte nicht durch das IL-4 ELISA-System (EliPair Diaclone) nachgewiesen werden.

In gleicher Konzentration eingesetzt induzieren sowohl natürliches als auch rekombinantes IPSE/alpha-1 eine ähnlich hohe Ausschüttung von IL-4 aus basophilen Granulozyten (siehe Abbildung 4.9, Seite 45). Dementsprechend erfolgt auch die Hemmung der LPS-induzierten IL-6 Freisetzung aus Monozyten auf annähernd gleichem Niveau, so dass die Verwendung von rekombinant hergestelltem *E. coli*- anstelle von natürlichem IPSE/alpha-1 in der *in vitro*-Kultur zulässig ist.

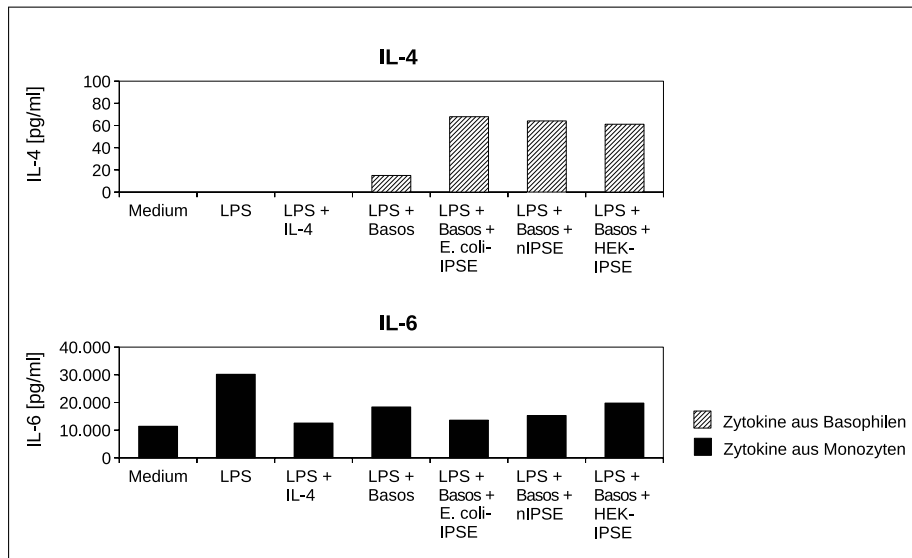


Abbildung 4.9: Die Zytokinfreisetzung in der Kokultur in Gegenwart verschiedener IPSE-Präparationen. Dargestellt ist ein repräsentatives von vier durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; Monozyten und Basophile je 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

4.3.4 Der gegenseitige Einfluss von Monozyten und Basophilen in der Kokultur

Dass IL-4, welches basophile Granulozyten als Antwort auf die Stimulation mit LPS und IPSE/alpha-1 sezernieren, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus mit LPS-stimulierten Monozyten *in vitro* hemmt, habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) zeigen können. Unklar ist, ob es für die Induktion dieser Hemmung zusätzlich einer direkten Zell-Zell-Interaktion bedarf und inwieweit sich Monozyten und basophile Granulozyten in der Zellkultur gegenseitig beeinflussen.

4.3.4.1 Die Morphologie von Basophilen und Monozyten in der Kokultur

Basophile sezernieren nach ihrer Aktivierung neben IL-4 (und IL-13) noch weitere Mediatoren wie Histamin und Leukotriene. Letztere werden wie das frühe IL-4 durch Degranulation freigesetzt. Die Granula der Basophilen lassen sich durch Anfärbung von Zytospinpräparaten mit May-Grünwald-Lösung gut visualisieren und stellen ein zuverlässiges optisches Indiz für den Aktivierungszustand der basophilen Granulozyten dar [5].

Zunächst wurde die Morphologie der Basophilen in Kultur ohne Gegenwart weiterer Zellen untersucht. Dazu wurden basophile Granulozyten in IL-3-haltigem Medium in An- und Abwesenheit von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 kultiviert, zu verschiedenen Zeiten geerntet, in einer Zytospinzentrifuge zentrifugiert und mit May-Grünwald-Lösung gefärbt (siehe Abbildung 4.10, Seite 46).

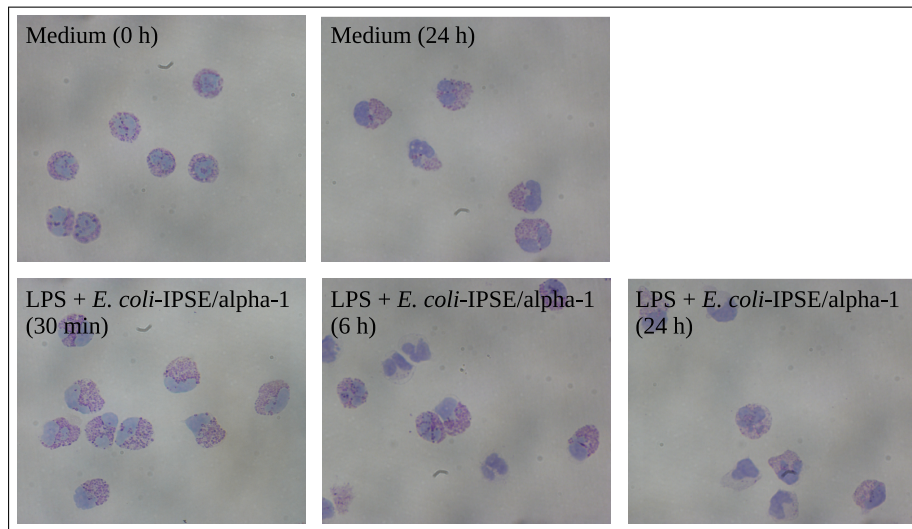


Abbildung 4.10: Die Morphologie unstimulierter und stimulierter humaner Basophiler in der Zellkultur; 1.000fach vergrößerte May-Grünwald-Färbung von Zytospinpräparaten (Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Die in Medium kultivierten **basophilen Granulozyten** sind stark granuliert. Die Granula sind grobkörnig und dicht dunkelviolettfärbt. Dabei sind sie vor Kulturbeginn (0 h) gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt; innerhalb von 24 Stunden kommt es zu einer Polarisierung der Granula auf der einen Seite der Zelle, während der Kern die andere Hälfte der Zelle einnimmt. Außerdem verlieren die Basophilen allmählich ihre kugelförmige Form. Der Zellkern ist in zwei bis fünf Segmente unterteilt, von dichter Chromatinstruktur und von Granula überlagert.

Nach 30 Minuten in Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 ist bereits eine Polarisierung der Zellen erkennbar, jedoch sind alle Zellen noch stark granuliert. Innerhalb der ersten sechs Stunden degranuliert etwa die Hälfte aller Basophilen, während die anderen 50 % keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den 30 Minuten lang inkubierten Zellen aufweisen. Wie die nicht stimulierten Basophilen büßen auch die stimulierten basophilen Granulozyten innerhalb von 24 Stunden größtenteils ihre kugelförmige Form ein.

Es ist davon auszugehen, dass auch in der Kokultur mit Monozyten die basophilen Granulozyten durch die Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 aktiviert werden. Den Einfluss der Monozyten zeigt Abbildung 4.11 auf Seite 47.

Basophile, die in Gegenwart von LPS und Monozyten kultiviert wurden, sind teils degranuliert und zeigen alle eine Polarisierung vergleichbar der monokultivierter Basophiler. Die noch granulierten Basophilen weisen gut sichtbare, dunkel angefarbte und klar abgegrenzte Granula auf.

Im Gegensatz dazu sind fast alle Basophilen, die neben Monozyten und LPS zusätzlich mit *E. coli*-IPSE/alpha-1 kultiviert wurden, degranuliert. Nur wenige Granula konnten schwach angefarbt werden. Insgesamt unterscheidet sich das Erscheinungsbild der mit Monozyten kokultivierten Basophilen also kaum von dem monokultivierter Basophiler. Auch in Gegenwart von Monozyten sind baso-

phile Granulozyten durch LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 aktivierbar und zeigen eine vergleichbare Morphologie wie in der Monokultur.

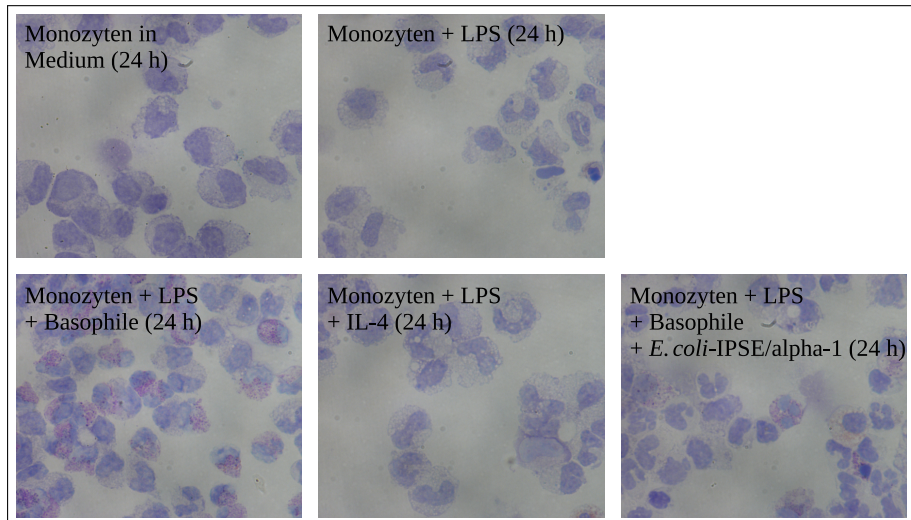


Abbildung 4.11: Die Morphologie unstimulierter sowie stimulierter humaner Monozyten und Basophiler in der Kokultur; 1.000fach vergrößerte May-Grünwald-Färbung von Zytospinpräparaten (Monozyten 250.000 /ml, Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Die in Medium inkubierten **Monozyten** besitzen eine runde Form mit zu meist glatter Oberfläche und verhältnismäßig wenig Zytoplasma. Ihr Kern ist groß und rund, anstatt die für Monozyten charakteristische bohnenartige Form aufzuweisen. Nach Zugabe von LPS werden kleine Zellausläufer sichtbar und die Zellen erscheinen angeschwollen. Das Zytoplasma wirkt aufgelockert. All dieses sind deutliche Hinweise auf eine Aktivierung der Monozyten. Noch stärker ausgeprägt ist dieser Effekt in Gegenwart von LPS und IL-4. Mit LPS stimulierte Monozyten in Gegenwart von Basophilen zeigen ein ähnliches Aussehen.

Auffallend ist beim Blick über das gesamte Präparat, dass sich bei zusätzlicher Gabe von *E. coli*-IPSE/alpha-1 als Stimulus in die Zellkultur Aggregate von Monozyten und basophilen Granulozyten ausbildeten, welche sich auch durch Resuspendieren der geernteten Zellen nicht vollständig auflösen ließen. Diese Beobachtung lässt eine Interaktion zwischen den IPSE/alpha-1-aktivierten Basophilen und den LPS-stimulierten Monozyten vermuten.

4.3.4.2 Das Migrationsverhalten Basophiler *in vitro*

Nachdem die morphologischen Untersuchungen eine Aggregation von Basophilen und Monozyten in Gegenwart von LPS und IPSE/alpha-1 gezeigt hatten, *in vitro* jedoch allein der Zusatz von rekombinantem humanen IL-4 zu LPS-stimulierten Monozyten deren Aktivierung und Zytokinfreisetzung senkt, stellte sich die Frage, ob es für die Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten Monozyten durch IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile einer Zell-Zell-Interaktion bedarf.

In der Zellkultur ist es möglich, Zellen durch den Einsatz spezieller Membraneinsätze, sogenannter Transwells[®], räumlich voneinander zu trennen, während über Poren in den Membranen ein ungehinderter Stoffaustausch gewährleistet sein sollte. Erste Experimente wurden mit Membraneinsätzen verschiedener Hersteller und unterschiedlicher Porengröße durchgeführt. Folgende Membraneinsätze wurden getestet:

- Greiner Bio-One
ThinCertTM: 24 Well, Pore \varnothing 0,4 sowie 1, 3 und 8 μm , transparent
- Corning Inc. costar[®]
6,5 mm Transwell[®]: 24 Well, Pore \varnothing 3 μm
- NuncTM
Cell Culture Inserts: 24 Well, Pore \varnothing 8 μm .

Zunächst wurden die o. g. Membraneinsätze bezüglich der freien Diffusion von in Lösung befindlichen Stoffen untersucht.

Hierzu wurden basophile Granulozyten in IL-3-haltigem Medium in Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 kultiviert. Zusätzlich wurden Membraneinsätze mit unterschiedlichen Porengrößen (s. o.) eingesetzt und mit Medium befüllt. Nach 24 Stunden wurden diese Einsätze in eine neue sterile Zellkulturplatte überführt. Sowohl aus den Kavitäten der ursprünglichen Zellkulturplatte (Wells: siehe weiße Balken in Abbildung 4.12 auf Seite 48) wie auch den Membraneinsätzen (Transwells: siehe graue Balken in Abbildung 4.12 auf Seite 48) wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und die darin enthaltenen IL-4 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt.

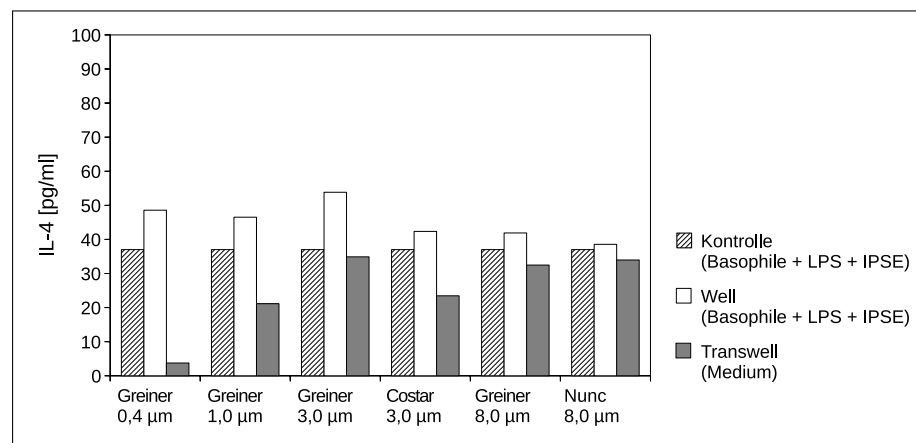


Abbildung 4.12: Die Verteilung von IL-4 in verschiedene Kompartimente nach 24 h Kultur humaner Basophiler in Gegenwart diverser Transmembran-Einsätze. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei durchgeführten Experimenten. (Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Dabei erwies sich der Membraneinsatz von NuncTM von der Handhabung her als schwierig: er wird nicht wie alle anderen verwendeten Einsätze in die Kavitäten der Zellkulturplatte eingegangen, sondern hineingestellt. Kleine Füßchen

an der Unterseite des Einsatzes stellen sicher, dass die Membran des Einsatzes den Boden der Kavität nicht berühren kann. Es kann jedoch leicht passieren, dass bei unvorsichtiger Handhabung der Kulturplatte Medium aus dem Membraneinsatz in die Kavität überläuft. Auffallend ist, dass die Zytokinkonzentrationen in den Kavitäten der Zellkulturplatte, in denen die produzierenden Zellen lokalisiert waren, stets höher waren als in den eingefügten Membraneinsätzen. Ein zu kleiner Porendurchmesser (0,4 und 1 μm) erlaubte entgegen den Herstellerangaben keine freie Diffusion der Zytokine, was entsprechend mit einer eingeschränkten Wirkung verbunden wäre. Relativ frei diffundierte das IL-4 lediglich durch 8 μm große Poren.

Im nächsten Schritt wurden Monozyten und basophile Granulozyten in An- und Abwesenheit von Membraneinsätzen kokultiviert. In die Kultur eingebracht wurden neben Einsätzen mit einem Porendurchmesser von acht Mikrometern (Greiner Bio-One ThinCertTM: 24 Well, Pore \varnothing 8 μm , transparent) auch welche mit einem Durchmesser von drei Mikrometern (Greiner Bio-One ThinCertTM: 24 Well, Pore \varnothing 3 μm , transparent und Corning Inc. costar[®] 6,5 mm Transwell[®]: 24 Well, Pore \varnothing 3 μm), da aufgrund der Zellgröße davon ausgegangen werden musste, dass bei einem angenommenen Durchmesser von 5–20 μm für Monozyten und 9–14 μm für Basophile die größeren Poren eine räumliche Trennung der Zellen nicht gewährleisten könnten.

Humane Monozyten wurden dazu als Standardansatz mit LPS stimuliert und in Gegenwart verschiedener Stimuli (IL-4; Basophile sowie Basophile und *E. coli*-IPSE/alpha-1) für 24 Stunden kultiviert. Zusätzlich wurden mit LPS stimulierte Monozyten (in den Kavitäten der Zellkulturplatte, Well) bereits zu Kulturbeginn durch o. g. Membraneinsätze von mit LPS und IPSE/alpha-1 stimulierten Basophilen (in den verschiedenen Membraneinsätzen, Transwell) separiert. In den gewonnenen Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA exemplarisch zwei Zytokine – IL-4 aus Basophilen und IL-6 aus Monozyten – bestimmt. Zusätzlich wurden die Kavitäten der Zellkulturplatte und die Membraneinsätze gründlich mit Medium gespült. Von den darin enthaltenen Zellen wurden Zytospinpräparate angefertigt, die mit May-Grünwald-Lösung gefärbt und fixiert wurden.

Abbildung 4.13 auf Seite 50 gibt einen Überblick über die im Zellkulturüberstand bestimmten Zytokinkonzentrationen. Allen Ansätzen mit Transmembran ist gemeinsam, dass stets in dem Kompartiment die Zytokinkonzentration höher war, in dem die produzierenden Zellen lokalisiert waren. Dementsprechend wurde in allen Kavitäten der Zellkulturplatte die jeweils höhere Konzentration an IL-6 und in allen Membraneinsätzen entsprechend die jeweils höhere Konzentration an IL-4 ermittelt. Eine Inhibierung der LPS-induzierten IL-6 Freisetzung aus Monozyten konnte nur in dem Ansatz beobachtet werden, in dem der Membraneinsatz von Greiner Bio-One mit einem Porendurchmesser von 8 μm , welcher eine freie Diffusion von IL-4 ermöglichte, eingesetzt worden war.

Ein Blick auf die Zytospinpräparate und die vorherige Betrachtung der Membraneinsätze unter dem Mikroskop zeigte, dass in allen Fällen – wie für die Poren mit einem Durchmesser von 8 μm bereits vermutet – fast alle basophilen Granulozyten aus dem Membraneinsatz in die Kavität der Zellkulturplatte gewandert waren. Somit kann auch die bei dem Membraneinsatz von Greiner Bio-One (ThinCertTM: 24 Well, Pore \varnothing 8 μm , transparent) beobachtete Inhibierung der LPS-induzierten IL-6 Freisetzung aus Monozyten nicht als zwingend zellkontaktunabhängig angesehen werden. Desweiteren muss den Basophilen in

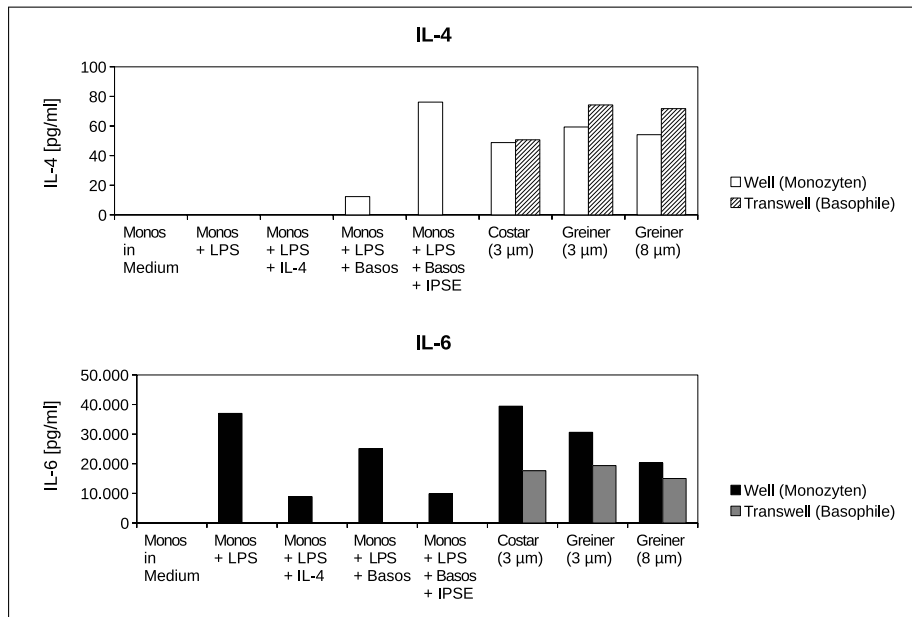


Abbildung 4.13: Die Verteilung von IL-4 und IL-6 in verschiedene Kompartimente nach 24 h Kokultur von humanen Monozyten und Basophilen. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei durchgeführten Experimenten.

(Monozyten 250.000/ml, Basophile 250.000/ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Anbetracht ihrer Größe (9–14 µm) und der Tatsache, dass sie durch Poren mit einem Durchmesser von 3 µm wandern, eine erstaunliche Elastizität zugeschrieben werden.

Der Frage, welchem auslösenden Reiz das Migrationsverhalten der basophilen Granulozyten zuzuschreiben ist, sollte in einem weiteren Experiment, in dem ausschließlich Membraneinsätze von Corning Inc. mit einem Porendurchmesser von 3 µm eingesetzt wurden, nachgegangen werden. Wie im vorangegangenen Versuch wurden die mit LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 stimulierten Basophilen im Membraneinsatz platziert.

Bereits Medium allein führt zu einer gewissen Delokalisation der basophilen Granulozyten aus dem Membraneinsatz in die Kavität der Zellkulturplatte. Dabei waren nahezu alle Basophilen in der Kavität vollkommen degranuliert, während im Membraneinsatz vereinzelt noch schwach granulierte Basophile vorgefunden wurden (siehe Abbildung 4.14, Seite 51). Interessanterweise war die Delokalisation nicht ganz so ausgeprägt, wenn dem Medium in der Zellkulturplatte noch LPS zugesetzt worden war. In diesem Fall waren auch die Basophilen im Membraneinsatz nach 24 Stunden trotz Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 größtenteils noch hochgradig granuliert und wiesen ferner eine runde intakte Form auf. Sehr stark ausgeprägt ist die Bewegung der Basophilen aus dem Membraneinsatz in jene Kavitäten der Zellkulturplatte, die Monozyten bzw. deren Überstand enthielten. Auffallend ist, dass auch hier die noch im Membraneinsatz befindlichen basophilen Granulozyten in Anwesenheit von LPS intakter aussehen. Beim Vergleich von Medium und LPS gegen Monozyten-

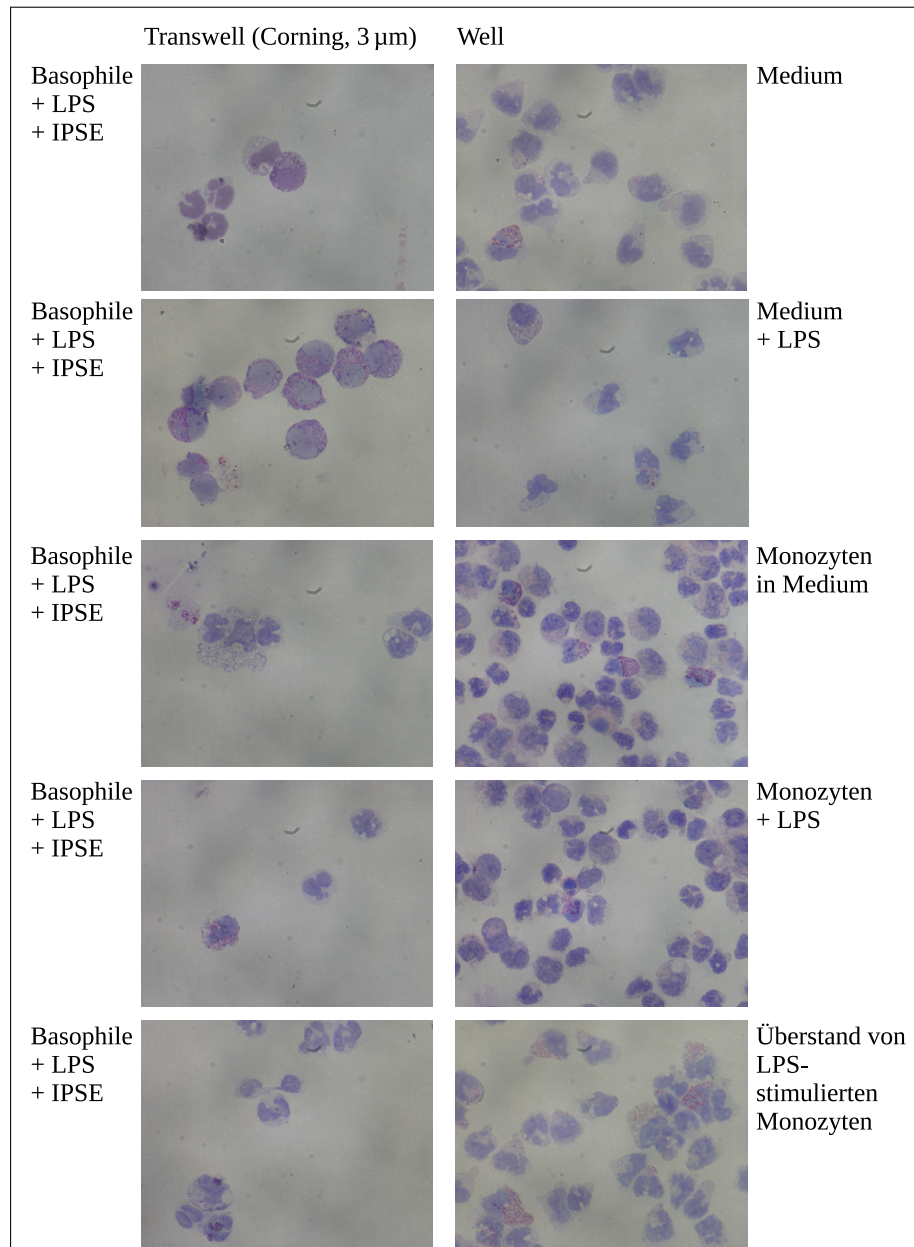


Abbildung 4.14: Das Migrationsverhalten und die Morphologie humaner Basophiler *in vitro* nach 24 h; 1.000fach vergrößerte May-Grünwald-Färbung von Zytospinpräparaten
(Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml
Monozyten 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml und Überstand LPS-stimulierter Monozyten)

Überstand mit LPS wird deutlich, dass in Gegenwart monozytärer Zytokine wesentlich mehr Basophile aus dem Membraneinsatz in die Kavität der Zellkulturplatte übergehen. Der auslösende Reiz für das Verlassen der Membraneinsätze scheint ein hier nicht vollständig analysierter Stimulus zu sein.

4.3.4.3 IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile hemmen zellkontaktunabhängig die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung aus Monozyten *in vitro*

Eine vollständige räumliche Trennung von basophilen Granulozyten und Monozyten mittels Transmembraneinsätzen bei gleichzeitiger optimaler Diffusion der freigesetzten Zytokine konnte also nicht befriedigend realisiert werden. Um dennoch zu klären, ob die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Monozyten durch IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile zellkontaktunabhängig erfolgt, wurde ein anderer Versuchsansatz gewählt:

In einem weiteren Experiment wurden Basophile in Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 wiederum in IL-3-haltigem Medium kultiviert und nach 6 Stunden deren Überstände gewonnen (Maximum der IL-4 Ausschüttung). Die Basophilen-Überstände wurden unmittelbar LPS-stimulierten Monozyten, die ebenfalls seit bereits 6 Stunden in Kultur waren, zugesetzt und die Kultur weitere 18 Stunden fortgesetzt. Zum Vergleich wurden humane Monozyten (250.000 /ml) in Medium 24 Stunden kultiviert bzw. mit LPS stimuliert und in Gegenwart verschiedener Stimuli (Basophile, IL-4 sowie Basophile und *E. coli*-IPSE/alpha-1) für 24 Stunden kultiviert. Exemplarisch wurden die Zytokinkonzentrationen von IL-4 (von Basophilen freigesetzt) sowie IL-6 (von Monozyten freigesetzt) mittels ELISA in den gewonnenen Zellkulturüberständen bestimmt. Dabei konnte exogen zugeführtes rekombinantes humanes IL-4 nicht durch das IL-4 ELISA-System (EliPair Diaclone) detektiert werden.

Unabhängig vom Zeitpunkt der Gabe von LPS zu den Monozyten vermögen die im Basophilen-Überstand (ÜS) enthaltenen Zytokine die Freisetzung von IL-6 aus LPS-stimulierten Monozyten zu hemmen (siehe Abbildung 4.15, Seite 53). Dabei entsprechen in der Beschriftung der Abszisse die Zeitangaben von 0 h dem Kulturbeginn und 6 h dem Zeitpunkt der Gewinnung und des Zusatzes des Überstandes von mit LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 stimulierten Basophilen. In der Kokultur ist somit ein direkter Zell-Zell-Kontakt für die Inhibierung der LPS-induzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten durch IPSE/alpha-1-stimulierte Basophile nicht zwingend erforderlich, auch wenn wie in Kapitel 4.3.4.1 und 4.3.4.2 dargestellt basophile Granulozyten und Monozyten miteinander interagieren und Zell-Zell-Kontakt-abhängige Effekte nicht gänzlich ausgeschlossen werden können.

4.3.5 Die Ausschüttung von IL-10 in der Kokultur

Bis hierhin lag der Fokus bei der Untersuchung der Inhibierung der Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten durch IPSE/alpha-1-stimulierte Basophile auf proinflammatorisch wirksamen Zytokinen, wie dem IL-6. Die bisherigen Ergebnisse für das antiinflammatorische IL-10 waren nicht eindeutig: exogen zugeführtes, rekombinantes IL-4 vermag, die LPS-induzierte IL-10 Freisetzung aus Monozyten höchst signifikant zu senken; die Anwesenheit von IPSE/alpha-1-

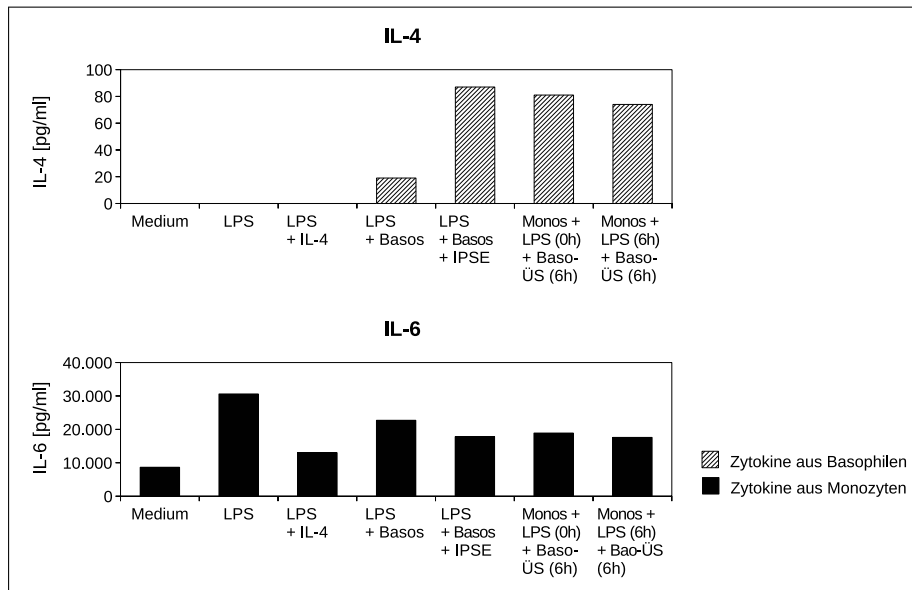


Abbildung 4.15: Die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus humanen Monozyten durch den Überstand LPS- und IPSE/ α -1-stimulierter Basophiler. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten. (Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/ α -1 100 ng/ml)

aktivierten Basophilen dagegen hat keinen signifikanten Einfluss auf die monozytäre Ausschüttung von IL-10 (siehe Abbildung 1.3, Seite 10).

Die Gegenwart von basophilen Granulozyten scheint, die Freisetzung von IL-10 aus LPS-stimulierten Monozyten zu fördern. Das ist statistisch allerdings nur dann der Fall, wenn die Signifikanz für die gemittelten, normalisierten Daten berechnet wird; $p=0,017$. Werden die Ereignisse für jedes individuelle Experiment betrachtet, wie in Kapitel 3.8 auf Seite 32 beschrieben, so ist $p=0,064$ und die Erhöhung der IL-10 Freisetzung nicht signifikant. Der Zusatz von IPSE/ α -1 zu Basophilen in Gegenwart von LPS-stimulierten Monozyten führt dann zu einer hoch signifikanten Hemmung der IL-10 Ausschüttung.

In den einzelnen Experimenten wurden verschiedene Szenarien beobachtet:

- Die Gegenwart Basophiler *erhöht* die IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten und der Zusatz von IPSE/ α -1 zu diesen
 - *senkt* die IL-10 Freisetzung, jedoch *nicht unter* das Niveau LPS-stimulierter Monozyten.
 - *senkt* die IL-10 Freisetzung *auf* das Niveau LPS-stimulierter Monozyten.
 - *senkt* die IL-10 Freisetzung *unter* das Niveau LPS-stimulierter Monozyten.
- Die Gegenwart Basophiler *senkt* die IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten und der Zusatz von IPSE/ α -1 zu diesen *senkt* die IL-10 Freisetzung noch weiter.

Eine Korrelation zwischen der Menge an IL-4, welches aus den LPS- bzw. LPS- und IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen freigesetzt wurde, und dem Verlauf der IL-10 Freisetzung aus LPS-aktivierten Monozyten besteht nicht (siehe Anhang Tabelle A.1, Seite 86 und Tabelle B.1, Seite 87). In Tabelle A.1 sind für jedes einzelne Experiment die normalisierten Werte bezogen auf die IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten aufgelistet; Tabelle B.1 enthält die zugehörigen Konzentrationen an IL-4. Bemerkenswert ist auch die Varianz im Rückgang der Freisetzung von IL-10 aus LPS-stimulierten Monozyten in Gegenwart von rekombinantem humanen IL-4: von 100 % auf 80–15 % (Spalte 4 in Tabelle A.1).

Um die Einflüsse einzelner Faktoren auf die IL-10 Freisetzung aus Monozyten *in vitro* besser charakterisieren zu können, wurden in einem weiterführenden Experiment zunächst isolierte humane Monozyten allein oder in Kombination mit basophilen Granulozyten desselben Donors in Gegenwart verschiedener Stimuli (LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml sowie *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert und in den gewonnenen Zellkulturüberständen die IL-10 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt.

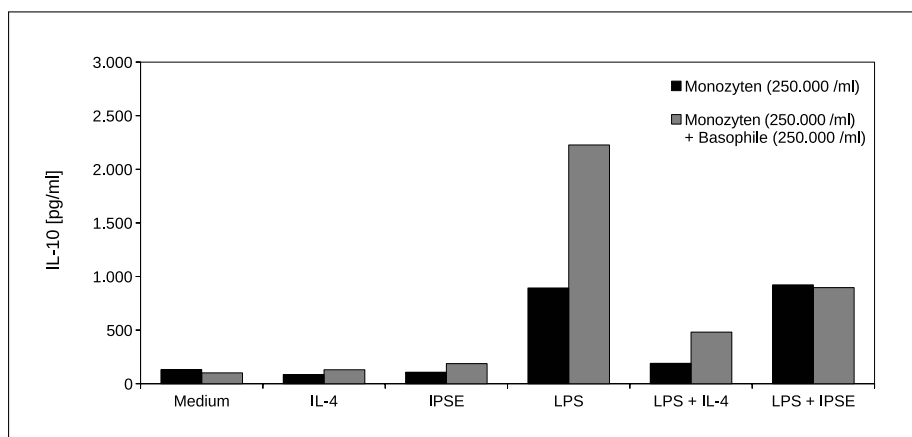


Abbildung 4.16: Die IL-10 Konzentrationen in Zellkulturüberständen von stimulierten humanen Monozyten und Basophilen. Dargestellt ist ein repräsentatives von acht durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Weder Medium noch die Gegenwart von rekombinantem humanen IL-4 oder *E. coli*-IPSE/alpha-1 allein führen zu einer nennenswerten Freisetzung von IL-10 aus Monozyten – sei es nun in Ab- oder Anwesenheit basophiler Granulozyten (siehe Balkenpaare 1–3 in Abbildung 4.16 auf Seite 54). Die Anwesenheit von Basophilen per se beeinflusst also die Monozyten nicht, zumindest bezogen auf die hier untersuchte Freisetzung von IL-10, und auch der Zusatz von *E. coli*-IPSE/alpha-1 führt zu keiner Aktivierung der Monozyten in Medium. Dies geschieht erst nach Zusatz von LPS, wird durch die Gegenwart Basophiler Granulozyten weiter gesteigert (siehe Balkenpaar 4 in Abbildung 4.16) und kann durch rekombinantes humanes IL-4 wieder gesenkt werden – jedoch nicht auf Medium-Niveau und in Anwesenheit Basophiler auch nicht so weit wie in

deren Abwesenheit (siehe Balkenpaar 5 in Abbildung 4.16). Gleiches gilt für den Zusatz von *E. coli*-IPSE/alpha-1 zu LPS-stimulierten Monozyten in Gegenwart Basophiler (vergleiche graue Balken von Balkenpaar 4 und 6 in Abbildung 4.16), während der Zusatz von *E. coli*-IPSE/alpha-1 zu LPS-stimulierten Monozyten deren IL-10 Freisetzung nicht verändert (vergleiche schwarze Balken von Balkenpaar 4 und 6 in Abbildung 4.16).

Die Frage ist, warum und wie die Gegenwart basophiler Granulozyten die IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten verändert. Und welche Rolle in diesem Zusammenhang kinetische Effekte spielen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden humane Monozyten mit Basophilen im autologen System für 24 Stunden kokultiviert – wiederum in Gegenwart von LPS (10 ng/ml), IL-4 (0,12 ng/ml) und *E. coli*-IPSE/alpha-1 (100 ng/ml). Zusätzlich wurden separat basophile Granulozyten in IL-3-haltigem Medium mit LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 stimuliert und deren Überstände nach bereits 6 Stunden gewonnen. Die Basophilen-Überstände (ÜS) wurden unmittelbar zu Monozyten, die ebenfalls seit 6 Stunden in Kultur waren – entweder in Medium oder mit LPS stimuliert – zugesetzt und die Kultur weitere 18 Stunden fortgesetzt. In den gewonnenen Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA die Konzentrationen an IL-4 sowie IL-10 bestimmt. Nicht dargestellt werden die ermittelten Konzentrationen an IL-4: In Gegenwart von LPS allein wird deutlich weniger Zytokin freigesetzt (34 pg/ml) als in Gegenwart von LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 (115 pg/ml).

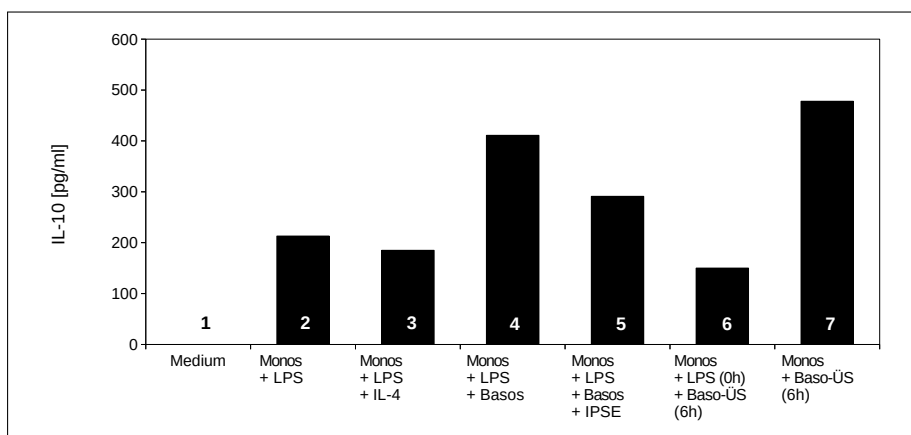


Abbildung 4.17: Die IL-10 Konzentrationen in Zellkulturüberständen von stimulierten humanen Monozyten und Basophilen. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; Monozyten 250.000 /ml, Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Wie zuvor bereits festgestellt, erhöht die Anwesenheit von Basophilen die Sekretionsrate an IL-10 aus LPS-stimulierten Monozyten, welche IL-10 in moderaten Mengen (ca. 200 pg/ml) sezernieren (vergleiche Balken 2 und 4 in Abbildung 4.17 auf Seite 55). Der weitere Zusatz von *E. coli*-IPSE/alpha-1 zu Basophilen und LPS-stimulierten Monozyten vermag zwar diese Erhöhung zu reduzieren (Balken 5), jedoch nicht unter das Niveau LPS-stimulierter Monozyten (Balken 2). Erstaunlicherweise senkt die Zugabe des Basophilen-Überstandes die

IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten (vergleiche Balken 2 und 6), während in Anwesenheit von Basophilen und *E. coli*-IPSE/alpha-1 (Balken 5) die IL-10 Freisetzung gegenüber der aus LPS-stimulierten Monozyten erhöht ist.

An dieser Stelle können Zell-Zell-Interaktionen als Ursache für die erhöhte IL-10 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten in Gegenwart von basophilen Granulozyten nicht ausgeschlossen werden.

Desweiteren fällt die sehr hohe Freisetzung von IL-10 aus in Medium kultivierten Monozyten auf, denen nach 6 Stunden Basophilen-Überstand zugesetzt worden war (Balken 7). Vermutlich ist ein Teil dieses Effektes dem immer noch im Basophilen-Überstand vorhandenen LPS, das neben *E. coli*-IPSE/alpha-1 zur Stimulation der Basophilen eingesetzt worden war, zuzuschreiben. Gleichzeitig kann vermutlich nicht von einer Beteiligung des ebenfalls im Überstand vorhandenen basophilen IL-4 ausgegangen werden, da die simultane Gabe von LPS und rekombinantem humanen IL-4 zu Kulturbeginn (also nur 6 Stunden früher) von einer wesentlich geringeren IL-10 Freisetzung begleitet ist (Balken 3). Festzuhalten bleibt: der Überstand von mit LPS und IPSE/alpha-1 stimulierten Basophilen induziert die Freisetzung von IL-10 aus nicht LPS-stimulierten, ruhenden Monozyten; aus LPS-stimulierten Monozyten reduziert er die IL-10 Freisetzung. Dementsprechend existiert neben dem vermuteten Zell-Zell-Kontakt zwischen Monozyten und Basophilen ein weiterer, löslicher Faktor, der für die Aktivierung der Monozyten zur Freisetzung von IL-10 verantwortlich zu sein scheint.

4.4 Die Entwicklung eines für M2-Makrophagen spezifischen Phänotyps durch Monozyten in Gegenwart von IL-4

Dargestellt wurde somit nun, dass basophile Granulozyten im Zuge einer Infektion mit *S. mansoni* in Granulome um die Eier des Parasiten einwandern, wo sie auf IPSE/alpha-1 aus den Eiern und TLR-Agonisten aus dem Wirtsorganismus und dessen Mikrobiom treffen. Möglicherweise sind an der Rekrutierung der Basophilen Monozyten bzw. von ihnen freigesetzte Faktoren beteiligt. Die Basophilen werden in einem höchst inflammatorischen Umfeld aktiviert und sezernieren IL-4. Basophiles IL-4 inhibiert *in vitro* wahrscheinlich zellkontaktunabhängig die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten Monozyten. Zudem beeinflussen sich Basophile und Monozyten womöglich auch über direkten Zellkontakt. Erste Hinweise hierfür lieferten in der Zellkultur die zuletzt genannten Untersuchungen des antiinflammatorisch wirksamen IL-10.

In diesem Kontext sollte noch die Frage geklärt werden, ob sich bereits in der *in vitro*-Kultur eine Differenzierung der Monozyten in Gegenwart von rekombinantem und basophilem IL-4 andeutet und so die Richtung der immunmodulatorischen Effekte von IPSE/alpha-1 über die Freisetzung von antiinflammatorisch wirksamen IL-4 aus Basophilen hinaus bestimmt werden. Dazu wurden isolierte humane Monozyten in Medium sowie in Gegenwart von LPS und IL-4 für 24 bzw. 48 Stunden kultiviert und in der Durchflusszytometrie auf die Expression von CD14, CD206 und CD209 hin untersucht.

CD14 ist ein typischer Oberflächenmarker für Monozyten und an der Bindung von Lipopolysacchariden beteiligt [130, 150]. Er wird stark exprimiert auf frisch isolierten Monozyten.

CD206 (oder Makrophagen-Mannose-Rezeptor) ist ein C-Typ Lektin Rezeptor (CLR), der Mannose-Strukturen an Pathogenen bindet und die Endozytose von Glykoproteinen durch Makrophagen vermittelt [8]. Auf im Blut zirkulierenden Monozyten kann CD206 nicht nachgewiesen werden, wird aber in der Zellkultur nach einigen Tagen exprimiert und gilt als früher Marker der Makrophagenreifung [102].

CD209 (oder DC-SIGN) ist ebenfalls ein C-Typ Lektin Rezeptor mit hoher Affinität zu ICAM-2 und -3 Molekülen [42]. Die Bindung von Pathogenen an CD209 leitet deren Phagozytose ein. Durch Stabilisierung der Kontaktzone zwischen dendritischen und T-Zellen ermöglicht CD209 das T-Zell-Rezeptor Engagement.

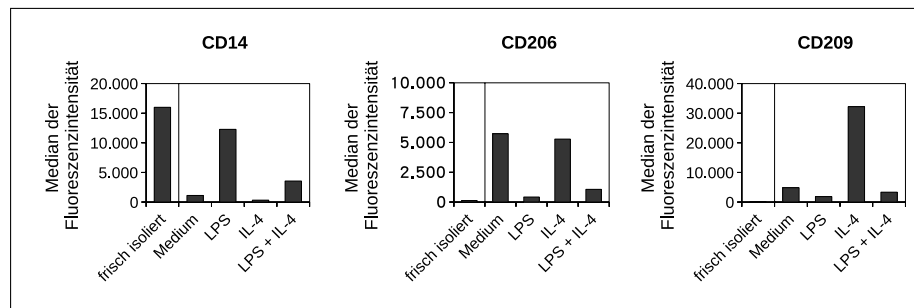


Abbildung 4.18: Der Einfluss von rekombinantem IL-4 auf die Expression von CD14, CD206 und CD209 LPS-stimulierter und unstimulierter humaner Monozyten in der *in vitro*-Kultur. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 48 h; Monozyten 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml)

Frisch isolierte Monozyten exprimieren in hohem Ausmaß CD14. Dagegen wurden nur wenige Zellen detektiert, die den DC-typischen Marker CD206 oder den Makrophagen-typischen Marker CD209 exprimierten (siehe Abbildung 4.18, Seite 57). Nach 48 Stunden ändert sich das Expressionsmuster: CD14 wird von in Medium kultivierten Monozyten kaum mehr exprimiert, während CD206 und in geringem Maß auch CD209 vermehrt exprimiert werden.

In Gegenwart von LPS ist die Expression von CD14 im Vergleich zu der unstimulierten Monozyten (Medium) deutlich gesteigert. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von rekombinantem humanen IL-4 zusätzlich zu LPS wieder aufgehoben.

Dementgegen ist die Expression von CD206 und CD209 in Gegenwart von LPS im Vergleich zu der von in Medium kultivierten, unstimulierten Monozyten gesenkt. Hier nun erhöht rekombinantes humanes IL-4 die Expressionsrate von CD206 und CD209, die charakteristisch für eine Polarisierung von Makrophagen in Richtung M2-Typ sind [79] – allein verabreicht sehr stark, in geringem Maß aber auch bei Zugabe zu LPS.

In sehr geringem Ausmaß konnten ähnliche Tendenzen auch in der Ko-kultur von LPS-stimulierten Monozyten mit IPSE/alpha-1-aktivierten Baso-

philen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.19, Seite 58). Allerdings wurden in diesem nur einmalig durchgeführten Experiment die Zellen bereits nach 24 Stunden Kultur analysiert. Die Freisetzung von IL-4 aus mit LPS und *E. coli*-IPSE/alpha-1 stimulierten Basophilen war mit 23 pg/ml vergleichsweise gering, so dass der M2-typische Phänotyp nur schwach ausgeprägt ist.

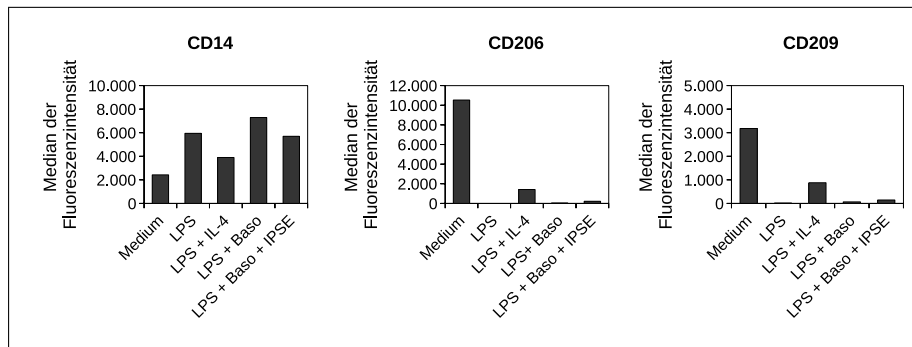


Abbildung 4.19: Der Einfluss von basophilem IL-4 auf die Expression von CD14, CD206 und CD209 LPS-stimulierter und unstimulierter humaner Monozyten in der Kokultur. Dauer: 24 h

(n = 1; Monozyten 250.000 /ml, Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

Gewiss ist es lohnenswert, dieses Experiment mit längerer Kulturdauer zu wiederholen und dann die Expressionsmuster von CD14, CD206 und CD209 zu verschiedenen Zeitpunkten (z. B. 24, 48 und 120 Stunden) zu analysieren. Im Rahmen der Doktorarbeit war mir dieses nicht mehr möglich. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine längere Versuchsdauer – wie im vorangegangenen Experiment – in Kombination mit einer stärkeren Freisetzung von IL-4 aus Basophilen nach Stimulation durch LPS und IPSE/alpha-1 zu einer stärkeren Expression von CD206 und CD209 und somit zu einer M2-Polarisierung der LPS-stimulierten Monozyten führen würden.

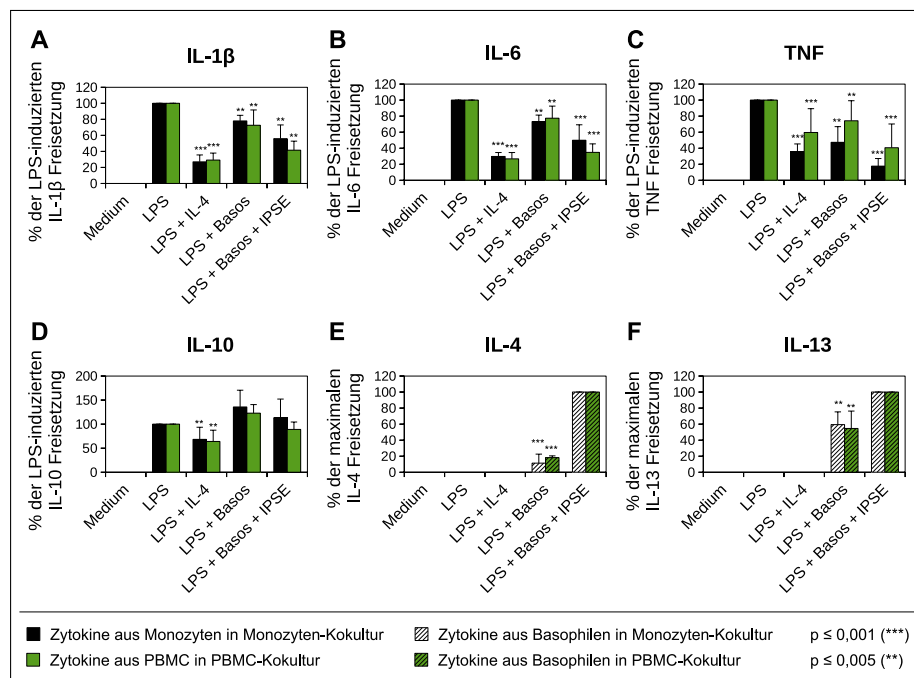
4.5 Auch die LPS-induzierte proinflammatorische Zytokinfreisetzung aus PBMC wird in Gegenwart IPSE/alpha-1-stimulierter Basophiler gehemmt

Der von den Eiern von *S. mansoni* sekretierte Faktor IPSE/alpha-1 ist *in vitro* immunmodulatorisch wirksam. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten Monozyten wird durch Kokultur mit IPSE/alpha-1-aktivierten basophilen Granulozyten gehemmt und die kokultivierten, LPS-stimulierten Monozyten entwickeln einen M2-typischen Phänotyp.

Um dieses artifizielle *in vitro*-System, welches ausschließlich zwei ausgewählte Zellpopulationen berücksichtigt, eingehender auf seine Relevanz für die *in vivo*-Situation zu überprüfen, wurden in weiteren Versuchsreihen PBMC anstelle von Monozyten mit LPS stimuliert und im autologen System mit IPSE/alpha-1-

aktivierten Basophilen kokultiviert. Nach 24 Stunden wurden von allen Ansätzen die Zellkulturüberstände gewonnen und darin nachfolgend die basophilen Zytokine IL-4 und IL-13 sowie die von LPS-stimulierten Monozyten bzw. PBMC freigesetzten Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF und IL-10 analysiert. Dabei wurde jeweils vor der Kultur der Anteil von Monozyten in den PBMC berücksichtigt und die Konzentration der PBMC so eingestellt, dass die darin enthaltenen Monozyten in einer Konzentration von 250.000 /ml vorlagen und damit der Monozytenkonzentration in allen vorangegangenen Experimenten entsprachen.

Die Daten für die freigesetzten Zytokine sind normalisiert dargestellt. Zum einen variiert die Zytokinfreisetzung aus Monozyten bzw. PBMC stark spenderabhängig, zum anderen können so Veränderungen in der Zytokinausschüttung durch Gegenwart verschiedener Stimuli zwischen Monozyten und PBMC leichter verglichen werden. In den Zellkulturüberständen wurden dazu die gemessenen Zytokinkonzentrationen an IL-1 β , IL-6, TNF und IL-10 in Relation zur Zytokinkonzentration nach LPS-Stimulation der Monozyten bzw. PBMC (100 %) gesetzt. Für die Zytokine IL-4 und IL-13 wurde der Ansatz der maximalen Interleukinfreisetzung (Ansatz 5: Monozyten und LPS und Basophile und *E. coli*-IPSE) als Bezugspunkt der Normalisierung gewählt.



Abbildungung 4.20: Die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung wird in der Kokultur humaner PBMC bzw. Monozyten mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen gehemmt. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten.

(Dauer: 24 h; PBMC 640.000 /ml entsprechend Monozyten 250.000 /ml, Monozyten 250.000 /ml und Basophile 250.000 /ml, Stimuli: LPS 10 ng/ml, IL-4 0,12 ng/ml, *E. coli*-IPSE/alpha-1 100 ng/ml)

In reinem Kulturmedium sind die Zellen nicht aktiviert; keines der o. g. monozytären Zytokine konnte im Zellkulturüberstand detektiert werden.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF sprechen ähnlich auf dieselben Stimuli an. Das immunregulatorisch wirksame IL-10 zeigt ein von den drei letztgenannten Zytokinen abweichendes, stimulationsabhängiges Sekretionsmuster.

LPS führt zur maximalen Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und TNF. Bereits durch Kokultur mit basophilen Granulozyten wird die Ausschüttung dieser Zytokine signifikant reduziert. LPS führt in diesem Ansatz zu einer geringfügigen Aktivierung der Basophilen, die daraufhin IL-4 sezernieren, welches die LPS-stimulierte proinflammatorische Zytokinfreisetzung inhibiert. Im Gegensatz dazu ist die IL-10 Freisetzung in Anwesenheit von zusätzlich Basophilen erhöht (vergleiche Balkenpaare 2 und 4 in Abbildung 4.20 D, Seite 59). Dieser Effekt ist spenderabhängig (siehe auch Anhang: Tabelle A.1, Seite 86).

Der inhibierende Effekt von IL-4 zeigt sich in der Positivkontrolle (Balkenpaare 3 in Abbildung 4.20 A – D): wurden die PBMC bzw. Monozyten mit LPS und IL-4 – welches nicht durch das verwendete IL-4 ELISA-System (EliPair Diacode) detektiert werden konnte – kultiviert, sezernieren sie signifikant weniger IL-1 β , IL-6, TNF und IL-10 im Vergleich zu PBMC bzw. Monozyten kultiviert mit LPS. *E. coli*-IPSE/ α -1 in Kombination mit basophilen Granulozyten hat eine mit rekombinantem IL-4 vergleichbare Wirkung auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch PBMC bzw. Monozyten. Und senkt analog die IL-10 Freisetzung im Vergleich zu LPS-stimulierten PBMC bzw. Monozyten in Gegenwart Basophiler ebenfalls signifikant.

Die im Zellkulturüberstand gemessene Konzentration der basophilen Zytokine IL-4 und IL-13 ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration an IL-1 β , IL-6 und TNF. Das Maximum der Freisetzung von IL-4 und IL-13 wird nach Stimulation mit LPS und *E. coli*-IPSE/ α -1 erreicht. Somit wird der durch IPSE/ α -1 induzierte inhibierende Effekt eindeutig durch basophile Zytokine vermittelt.

Anzumerken ist hierbei, dass in der PBMC-Kokultur mit Basophilen im Vergleich zur Monozyten-Kokultur mit Basophilen konstant niedrigere Zytokinkonzentrationen detektiert wurden. Trotzdem sind vergleichbare Effekte zu beobachten. Mit einem unterschiedlichen Anteil an Monozyten kann dies nicht erklärt werden, da die PBMC-Zahl in der Kokultur auf 250.000 Monozyten/ml eingestellt worden war. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der PBMC-Kokultur mit einer höheren Gesamtzellzahl als in der Monozyten-Kokultur die sezernierten Zytokine vermehrt an Zellen gebunden wurden und so mittels ELISA nicht mehr detektierbar waren. Bemerkenswert ist in jedem Fall die Reproduzierbarkeit der inhibierenden Wirkung von IL-4 aus IPSE/ α -1-aktivierten Basophilen auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch LPS-stimulierte PBMC bzw. Monozyten.

Kapitel 5

Diskussion

Basophile Granulozyten spielen als Immunzellen nicht nur eine bedeutende Rolle bei allergischen Erkrankungen, bei denen sie Histamin und Leukotriene freisetzen, sondern sie besitzen auch die Fähigkeit, in großen Mengen die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 auszuschütten. Inzwischen sind verschiedene Stimuli bekannt, die Basophile aktivieren. Neben der antigenspezifischen Aktivierung im Rahmen einer Allergie können basophile Granulozyten durch eine Vielzahl weiterer Moleküle – wie Lektine, Antikörper, Zytokine, Komplementfaktoren, TLR-Liganden und Faktoren parasitärer Würmer – zur Zytokinfreisetzung angeregt werden [121]. Dies spricht dafür, dass auch basophile Granulozyten wichtige Aufgaben in der Regulation immunologischer Vorgänge übernehmen könnten [63, 90, 105].

Das von den Eiern des parasitischen Helminthen *S. mansoni* sekretierte Protein IPSE/alpha-1 ist ein Faktor, der es vermag, Basophile zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 zu stimulieren [108]. Da diese beiden Zytokine schon lange als wichtige Immunregulatoren bekannt sind [143], liegt die Annahme nahe, dass auch IPSE/alpha-1 immunmodulierend in Richtung einer antiinflammatorischen Immunantwort wirkt.

5.1 Die Bedeutung von basophilen Granulozyten im Granulom um *S. mansoni*-Eier

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass basophile Granulozyten wesentlich an der Induktion von Granulomen während einer Schistosomeninfektion beteiligt sind [4]. Dabei ist die Granulombildung um die Eier von *S. mansoni* von großer Bedeutung und dient dem Schutz der infiltrierten Gewebe vor toxischen Eiprodukten [4, 139]. Aber auch der Parasit ist auf die granulomatöse Reaktion des Wirts gegen seine Eier angewiesen: erst die inflammatorische Antwort ermöglicht die Translokation der Schistosomen-Eier aus den Mesenterialvenen in das intestinale Lumen und damit ihre – die Fortpflanzung des Parasiten sichernde – Ausscheidung mit den Fäzes [23, 50, 132].

5.1.1 Basophile werden in das Granulom rekrutiert

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl neuer Reagenzien und Methoden entwickelt, welche der Untersuchung basophiler Granulozyten dienen. Vor allem Basophile der Maus waren aufgrund ihrer geringen Anzahl an basophilen Granula histologisch nur schwer nachweisbar [135]. Irrtümlich wurde lange Zeit sogar vermutet, dass Basophile in Mäusen möglicherweise nicht existent sind [28, 124]. Die Identifikation der für Maus-Basophile spezifischen Mastzellprotease-8 (mMCP8) und die Entwicklung eines gegen sie gerichteten Antikörpers ermöglichten erstmals den immunhistochemischen Nachweis von Maus-Basophilen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten [133].

In der vorliegenden Arbeit konnten basophile Granulozyten zweifelsohne in Leber- und Darmschnitten von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.1, Seite 35). Typisch ist ihre ausschließliche Lokalisation im Granulom. Besonders deutlich wird diese bei Betrachtung der Darmschnitte: basophile Granulozyten sind – wie die Eier von *S. mansoni* – nur in der äußeren Darmwand anzutreffen. In allen gesunden Geweben ließen sich ebenfalls keine Basophilen nachweisen, was für eine Rekrutierung der Basophilen in das aufgrund der Schistosomeninfektion entzündete Gewebe spricht.

Dabei muss vermutlich davon ausgegangen werden, dass sich stets nur jene basophilen Granulozyten nachweisen lassen, deren Granula – der Speicherort der Mastzellproteasen [99, 133] – noch gefüllt sind. Degranulierte Basophile sind vermutlich mangels Mastzellprotease-8 nicht mehr nachweisbar. Da bekannt ist, dass IPSE/alpha-1 zur Degranulation von Basophilen führt [108], übersteigt das tatsächliche Ausmaß an Basophilen, die in das Granulom um die Eier von *S. mansoni* rekrutiert werden, vermutlich die Zahl der in den gefärbten Schnitten sichtbaren basophilen Granulozyten.

5.1.2 Mastzellen werden nicht in das Granulom rekrutiert

Basophile Granulozyten und Mastzellen weisen morphologisch und funktionell viele Gemeinsamkeiten auf [124] und entwickeln sich vermutlich aus den gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark [5, 18]. Lange Zeit blieben Basophile aufgrund ihrer geringen Anzahl unbeachtet und fanden allenfalls in einem Atemzug mit Mastzellen Erwähnung [62, 113].

Zusätzlich und um letzte Zweifel an der Spezifität der Mastzellprotease-8 für Maus-Basophile auszuräumen, wurde eine Mastzellfärbung in Leber- und Darmschnitten von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen und gesunden Kontrollmäusen durchgeführt. Mastzellen wurden in großer Anzahl im Darm infizierter Mäuse vor allem in den Darmzotten und nicht um die in der Darmwand befindlichen Eier detektiert und zeigen damit ein vollkommen anderes Verteilungsmuster als die mMCP8-positiven Zellen (siehe Abbildungen 4.1, Seite 35 und 4.3, Seite 37).

Ähnlich sind bei einer Infektion von Mäusen mit dem gastrointestinalen Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* basophile Granulozyten und Mastzellen in diversen Geweben unterschiedlich verteilt. Untersucht wurden neben dem Darm auch die Milz und die Lunge. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Basophile und Mastzellen einhergehend mit ihrer Lokalisation verschiedene Funktionen bei der Abwehr des Parasiten wahrnehmen. So förderten Basophile u. a. die alternative Aktivierung von Makrophagen in der Lunge *N. brasiliensis*-infizierter

Mäuse, induzierten eine systemische Eosinophilie und waren an der Ausstoßung des Wurms beteiligt [88].

Es ist deshalb anzunehmen, dass auch bei der Infektion mit *S. mansoni* Basophile und Mastzellen trotz ihrer überlappenden Eigenschaften (z. B. Expression von FcεRI und IL-4 mRNA) individuelle Aufgaben erfüllen. Während Mastzellen dauerhaft in besonders großer Zahl in den Geweben lokalisiert sind, die im Kontakt zur Außenwelt stehen (also in der Haut sowie in der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes), und damit eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene darstellen, wie z. B. die Zerkarien von *S. mansoni*, wandern im Blut zirkulierende basophile Granulozyten in die, von der Schistosomeninfektion betroffenen, Gewebe (Darm und Leber) ein und könnten dort die Expression proinflammatorischer Zytokine als Folge entzündlicher Prozesse um die Schistosomen-Eier regulieren.

5.1.3 Der Stimulus für die Rekrutierung Basophiler in das Granulom ist unbekannt

Dass neben Mastzellen auch Basophile aus den Blutgefäßen in inflammatorisches Gewebe rekrutiert werden, ist längst hinreichend beschrieben [41, 47, 57, 58, 124, 149]. Jedoch wurden erst jüngst Basophile in Granulomen um die Eier von *S. mansoni* nachgewiesen [4, 116]. Ebenso wurde bereits untersucht, welche Faktoren bei der Adhäsion der Basophilen an das Gefäßendothel involviert sind [15] und welche Faktoren ihre Chemotaxis auslösen [134, 147], während es immer noch weitestgehend unklar ist, wodurch die transendotheliale Wanderung der Basophilen ausgelöst wird [56].

Erste Hinweise darauf, welche (Entzündungs-)Parameter für die Rekrutierung der basophilen Granulozyten in die Granulome um die Schistosomen-Eier verantwortlich sein könnten, lieferten die Zellkulturexperimente unter Verwendung von Membraneinsätzen (siehe Kapitel 4.3.4.2, Seite 47). Ursächlich für die Rekrutierung der Basophilen könnten demnach sein:

- LPS (ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, vertreten im Mikrobiom des Darmes),
- LPS-stimulierte Monozyten bzw.
- aus LPS-stimulierten Monozyten freigesetzte proinflammatorische Zytokine (IL-1β, IL-6, TNF u. a.).

Passend zu dieser Beobachtung wurde für mit IL-1β behandelte humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC) eine verstärkte transendotheliale Wanderung humaner basophiler Granulozyten [56] und für Leptin – ein Mitglied der IL-6 Zytokinfamilie – die Induktion der Migration, Degranulation und Zytokinsynthese humaner Basophiler [128] beschrieben. Zudem scheinen basophile Granulozyten mit Monozyten direkt zu interagieren (siehe Abbildung 4.11, Seite 47).

Interessant ist die Beobachtung, dass IPSE/alpha-1-stimulierte Basophile in Gegenwart von LPS weniger stark degranuliert waren als in reinem Medium (siehe Abbildung 4.14, Seite 51). Damit könnte die höchst entzündliche, LPS-angereicherte Umgebung im Darm zunächst die Translokation der Schistosomen-Eier aus den Mesenterialvenen durch die Darmwand in das intestinale Lumen

fördern und anschließend freigesetztes basophiles IL-4 dahingehend immunregulatorisch wirksam werden, eine exzessive Entzündung des Darmes zu verhindern. An dieser Stelle moduliert *S. mansoni* das Immunsystem des Wirts zugunsten beider.

Weiteren Aufschluss über den eigentlichen Stimulus für die Rekrutierung der Basophilen in das *S. mansoni*-Eigranulom könnten zukünftig Chemotaxis-Analysen liefern. Erste Untersuchungen, die noch im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführt werden konnten, ergaben, dass Basophile durch Poren mit einem Durchmesser von 3 μm auf Eotaxin (CCL11) – ein chemotaktisches Zytokin aus Eosinophilen, zugehörig der β -Chemokinfamilie – zuwandern, welches somit als Positivkontrolle eingesetzt werden könnte. Als Maß für die Zahl der gewanderten Zellen könnte die β -Hexosaminidase-Aktivität der Basophilen bestimmt werden [eigene nicht dargestellte Ergebnisse].

Ferner haben eigene Untersuchungen gezeigt, dass eosinophile Granulozyten, die mit bis zu 70 % aller Zellen im Spätstadium der Granulome dominieren [83], nicht durch lösliches Ei-Antigen (SmEA) angelockt werden. Entsprechend könnten auch für die Rekrutierung basophiler Granulozyten von den Schistosomen-Eiern freigesetzte Faktoren keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Hypothese bedarf jedoch noch einer experimentellen Überprüfung. Vieles deutet darauf hin, dass nicht Faktoren aus den Eiern von *S. mansoni* die Einwanderung der Basophilen in das Granulom auslösen, sondern konsekutive Effekte in Betracht gezogen werden müssen – derart, dass von primär in das Granulom eingewanderten Zellen Mediatoren freigesetzt werden, die wiederum zur Einwanderung von Eosinophilen bzw. Basophilen führen. Proinflammatorische Zytokine, sezerniert von Monozyten nach Kontakt mit pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), u. a. LPS – wie im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt – könnten denkbare Auslöser dieses Szenarios sein.

So wurde für eosinophile Granulozyten *Trichuris muris*-infizierter Mäuse bereits beschrieben, dass nicht nur vom Parasiten abstammende chemotaktische Faktoren, sondern auch Chemokine des Wirts wie Eotaxin jene in den Darm rekrutieren [24].

5.1.4 Die Interaktion von Basophilen und IPSE/alpha-1 im Granulom

Da das von den Schistosomen-Eiern sekretierte IPSE/alpha-1 aus basophilen Granulozyten die Zytokine IL-4 und IL-13 freisetzt [108], stellte sich die Frage, ob eine Interaktion zwischen beiden im Granulom visualisiert werden kann.

IPSE/alpha-1 wurde in weiteren Schnitten sowohl in infiziertem Leber- als auch Darmgewebe direkt unter der Ei-Schale und diffus verteilt im angrenzenden Granulom nachgewiesen (siehe Abbildung 4.2, Seite 36). Eine ähnliche Verteilung von IPSE/alpha-1 in Lebergewebe von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen wurde bereits 2006 von Schramm publiziert [109]. Anzumerken ist, dass IPSE/alpha-1 unabhängig von der Lokalisation der Basophilen detektiert wurde – jedoch nicht in jedem Ei bzw. Granulom. Dieser Befund kann vermutlich auf das unterschiedliche Alter der Granulome und damit einhergehende differentielle Proteinexpressionsmuster zurückgeführt werden: Die Eier werden von *S. mansoni* unreif abgelegt. Bei ihrer Wanderung durch die Gewebe reifen in ihnen innerhalb von zehn Tagen die Mirazidien heran. Exkretorisch-/sekretorische

Faktoren werden in Abhängigkeit vom Alter der Eier exprimiert. In Granulomen eingeschlossene Eier sterben schließlich ab und verkalken [61].

Offenbar haben auch einige in der Peripherie des Granuloms gelegene Zellen IPSE/alpha-1 aufgenommen; ebenfalls 2006 von Schramm publiziert [109]. Eine genauere Charakterisierung dieser Zellen wurde nicht durchgeführt. Sie ließe sich jedoch durch Zusatz eines markierten, gegen IPSE/alpha-1 gerichteten Antikörpers zu isolierten Zellgemischen, die aus den Granulomen infizierter Mausegewebe gewonnen werden könnten, in der Durchflusszytometrie bewerkstelligen. Einfacher könnten vermutlich zusätzlich isolierte humane Zellen des peripheren Blutes mit IPSE/alpha-1 inkubiert und anschließend ebenso durchflusszytometrisch analysiert werden.

Auch wenn eine direkte Interaktion zwischen IPSE/alpha-1 und basophilen Granulozyten hier nicht beobachtet wurde, ist sie dennoch nicht auszuschließen, da Basophile innerhalb kürzester Zeit nach ihrer Stimulation degranulieren und somit vermutlich mittels anti-mMCP8 Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden können.

5.2 Die Aktivierung von Basophilen

Eine Vielzahl an Signalen induziert die Aktivierung von Basophilen. Die antigenspezifische Aktivierung im Zuge einer allergischen Reaktion erfolgt hauptsächlich durch eine Quervernetzung von FcεRI-gebundenen IgE-Molekülen [113]. Aber auch Lektine, Antikörper (IgE, IgG und IgD), Zytokine (IL-3, IL-18 und IL-33), Komplementfaktoren, TLR-Liganden und Faktoren parasitärer Würmer vermögen Basophile zur Zytokinfreisetzung anzuregen [121].

5.2.1 Die kombinierte Stimulation von TLR und FcεRI führt zu einer synergistischen Erhöhung der Zytokinfreisetzung aus Basophilen

Einhergehend mit der Translokation der Schistosomen-Eier aus den Mesenterialvenen in das intestinale Lumen kommt es zum Eindringen von Mikrobiota in das Gewebe. Erstaunlicherweise überlebt der Wirt dieses jahrzehntelang, da entzündliche Prozesse im Darm kontrolliert werden.

Aus der Literatur [13, 68, 127] und eigenen, noch nicht publizierten Ergebnissen der FG ist bekannt, dass Basophile TLR exprimieren – u. a. auch TLR4, der durch LPS aktiviert wird. Dieses allein aktiviert basophile Granulozyten nur kaum, zusammen mit IPSE/alpha-1 aber führt es zu einer synergistischen Erhöhung der IPSE/alpha-1-induzierten IL-4 und IL-13 Freisetzung.

Ungeklärt ist, ob es spezieller Stimuli bzw. TLR-Liganden bedarf, um aus basophilen Granulozyten die Freisetzung von IL-4 und IL-13 mit ihrem anti-inflammatorischen Potential zu fördern oder ob dem Ganzen ein universeller Mechanismus zugrunde liegt.

Neben dem Einwandern von Mikrobiota und damit der Exposition von LPS, werden – ausgelöst durch von *S. mansoni*-Eiern sezernierte Faktoren – Entzündungsprozesse initiiert, die von nekrotischen Prozessen begleitet werden [50]. Nekrotische Zellen setzen Amphoterin (auch High-mobility group protein B1 oder kurz HMG-1 genannt) frei, das eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr

spielt. Auch HMG-1 interagiert mit einer Vielzahl an TLR, u. a. TLR2 und TLR4 [94].

Wie auch LPS vermag HMG-1 allein, basophile Granulozyten nur in äußerst geringem Maße zu aktivieren. Anders jedoch als LPS führt die gleichzeitige Stimulation von Toll-like und Fcε-Rezeptor via HMG-1 respektive IPSE/alpha-1 verglichen mit der alleinigen Stimulation des FcεRI via IPSE/alpha-1 zu keiner Erhöhung der IL-4 Freisetzung aus Basophilen. Ein differentielles Ansprechen der basophilen Granulozyten auf verschiedene TLR-Liganden ist durchaus sinnvoll und könnte individuelle Reaktionen auf diverse Pathogene ermöglichen. Basophile könnten so unterschiedliche Funktionen bei der Immunantwort gegen verschiedene Pathogene übernehmen. Desweiteren erlaubt eine solche Differenzierung es einem Parasiten wie *S. mansoni*, eine ansonsten inflammatorische, über TLR induzierte, Immunreaktion in Richtung einer das Immunsystem des Wirts regulierenden Antwort zu lenken. Dies gewährleistet beiden – Parasit und Wirt – ein langjähriges Überleben und ist das Ergebnis einer langen Koevolution von Helminth und Mensch [76].

5.3 Die Bedeutung von basophilem IL-4 bei der Immunregulation von Entzündungen

Eine zentrale Rolle im Zuge einer Infektion mit Helminthen spielt IL-4. Es besitzt wichtige immunregulative und entzündungshemmende Eigenschaften [65]. Es fördert *in vitro* die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen [1]. Ferner hemmt IL-4 die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch LPS-aktivierte Monozyten [82, 105, 136, 142] und führt zur alternativen Aktivierung von Makrophagen [30, 80].

Dass IL-4 nicht nur von Th2-Zellen, sondern auch von Basophilen sezerniert wird, wurde bei diesen Betrachtungen lange Zeit ignoriert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Monozyten in allergischen Reaktionen unter dem Einfluss von Basophilen in antiinflammatorische Monozyten mit einem M2-typischen Phänotyp umgewandelt werden können [30]. Desweiteren wurde beschrieben, wie von Monozyten abstammende dendritische Zellen in Gegenwart von IL-4 Th2-Antworten induzieren, indem sie die inflammatorische, Th1-polarisierende Zytokinproduktion blockieren [74].

5.3.1 Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wird durch die IPSE/alpha-1-induzierte Aktivierung von Basophilen gehemmt

Monozyten werden durch verschiedene Faktoren aktiviert, u. a. Mikroorganismen, IFN-γ, IL-1 und TNF sowie LPS. LPS ist ein Zellwandbestandteil von gramnegativen Bakterien, wie z. B. *E. coli*. Es kann über CD14 an Monozyten binden, wodurch eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade initiiert wird, welche zur Aktivierung von NF-κB führt. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Translokation in den Zellkern die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert [66].

Humane Monozyten – isoliert bzw. in PBMC – sezernieren infolge ihrer Stimulation mit LPS eine Reihe von Zytokinen, u. a. die proinflammatorischen

Interleukine IL-1 β , IL-6 und TNF sowie etwas verzögert das antiinflammatorische IL-10. Dass diese Zytokinfreisetzung durch IL-4 und IL-13 gehemmt wird, wurde mehrfach beschrieben [105, 137, 142, 143].

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (in der FG Zelluläre Allergologie am FZB, 2010) konnte ich zeigen, dass *in vitro* die LPS-induzierte Freisetzung von IL-1 β und IL-6 aus Monozyten in Anwesenheit basophiler Granulozyten und IPSE/alpha-1 signifikant gehemmt wird (siehe Abbildung 1.3, Seite 10). Dabei reduziert bereits allein die Anwesenheit Basophiler die monozytäre Freisetzung von IL-1 β und IL-6 signifikant, was auf eine Aktivierung der Basophilen durch das im Kulturansatz enthaltene LPS zurückgeführt werden kann. Die Hemmung korreliert mit der Höhe der IL-4 und IL-13 Spiegel, die nach Aktivierung der Basophilen mit IPSE/alpha-1 und LPS in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt werden konnten.

Vergleichbare Effekte konnten beobachtet werden, wenn anstelle von Monozyten PBMC mit LPS stimuliert und mit IPSE/alpha-1-aktivierten basophilen Granulozyten kokultiviert wurden (siehe Abbildung 4.20, Seite 59). Hier wurde neben IL-1 β und IL-6 auch noch das proinflammatorische TNF im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Daten sprechen dafür, dass das o. g. Kokultursystem zur *in vitro*-Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von IPSE/alpha-1 geeignet ist.

Eine gesonderte Betrachtung muss an dieser Stelle dem antiinflammatorischen IL-10 zugestanden werden. Von Monozyten sezerniertes IL-10 übernimmt eine autoregulative Funktion: Es inhibiert die Zytokinsynthese humaner Monozyten [37, 141]. Bei den T-Zellen führt IL-10 zu einer Unterdrückung der Th1-Immunantwort und begünstigt Th2-Reaktionen, indem es die Proliferation, Aktivierung und Zytokinsynthese von Th1- und NK-Zellen unterdrückt. Jedoch kann IL-10 auch die Zytokinproduktion von Th2-Zellen hemmen [20]. Da sowohl proinflammatorische Zytokine der Th1- als auch der Th2-Antwort die Freisetzung von IL-10 erhöhen, stellt die Ausschüttung von IL-10 ein Mittel dar, lang anhaltende und überschießende Entzündungen zu verhindern.

Exogen zugeführtes, rekombinantes IL-4 vermag, die LPS-induzierte IL-10 Freisetzung aus Monozyten höchst signifikant zu senken (siehe Abbildungen 1.3, Seite 10 und 4.20, Seite 59). Die Anwesenheit von IPSE/alpha-1-aktivierten basophilen Granulozyten dagegen hat keinen signifikanten Einfluss auf die monozytäre Ausschüttung von IL-10. Wie auch schon für IL-1 β , IL-6 und TNF gezeigt, scheint allein die Gegenwart von Basophilen im Ansatz der LPS-stimulierten Monozyten ihre Zytokinfreisetzung zu beeinflussen; diesmal jedoch nicht zu inhibieren, sondern eher zu steigern. Von diesem Niveau ausgehend führt die zusätzliche Gabe von IPSE/alpha-1 ebenfalls zu einer Hemmung der IL-10 Ausschüttung. Offenbar spielen hier weitere noch nicht untersuchte Faktoren aus Basophilen oder die Basophilen selbst eine entscheidende Rolle.

Ferner induzierte der Überstand von mit LPS und IPSE/alpha-1 stimulierten basophilen Granulozyten die Freisetzung von IL-10 aus nicht LPS-stimulierten, ruhenden Monozyten; aus LPS-stimulierten Monozyten reduzierte er die IL-10 Freisetzung (siehe Abbildung 4.17, Seite 55). Dieses kann nicht abschließend erklärt werden. Es scheint neben dem vermuteten Zell-Zell-Kontakt zwischen Monozyten und Basophilen ein weiterer, löslicher Faktor, für die Aktivierung der Monozyten zur Freisetzung von IL-10 verantwortlich zu sein. Bei der weiteren Untersuchung dieses Phänomens könnte eine in Anwesenheit eines neutralisierenden anti-humanen IL-10 Antikörpers durchgeführte Kokultur helfen, eventu-

elle Interaktionen zwischen dem von Basophilen freigesetzten entzündungshemmenden Faktor IL-4 sowie dem monozytären IL-10 auszuschließen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IPSE/alpha-1 basophile Granulozyten zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 aktiviert (wobei letzteres in der *in vitro*-Kultur keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung hat) und dass die Gegenwart von IL-4 die LPS-induzierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF auch in der Kokultur von PBMC mit Basophilen hemmt, während sich die Spiegel des entzündungshemmenden IL-10 nicht wesentlich ändern. Somit verschiebt sich das Verhältnis der pro- und antiinflammatorischen Zytokine zugunsten einer antientzündlichen Reaktion.

Ferner fördern die beiden Zytokine, IL-1 β und IL-6, die Entwicklung von Th17-Zellen und damit entzündliche Prozesse [2]. Interessanterweise sind eben jene Th17-Zellen in Mäusen unabdingbar für die Überwindung einer Infektion mit dem Darm-Pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Die orale Infektion von Mäusen mit diesem Pathogen führt zu chronischen Infektionen und Colitis mit transmuraler Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Darm. Die fibrotische Reaktion wird durch eine erhöhte Expression von Th1-, Th17- und profibrotischen Zytokinen begleitet, ähnlich wie bei M. Crohn Patienten [46]. Werden Salmonellen-infizierte Mäusen intraperitoneal auch *S. mansoni*-Eier injiziert, leiden sie im Vergleich zu nur mit Salmonellen infizierten Kontrollmäusen unter heftigen Entzündungen des Darmes. Ferner kann im Darm kaum IL-17 nachgewiesen werden [Kooperation Graß, G. (FG Entzündungsmodelle am FZB) und Schramm, G. (FG Zelluläre Allergologie am FZB), unveröffentlicht]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein: IPSE/alpha-1 aus den Schistosomen-Eiern stimuliert basophile Granulozyten, die im Darm nachgewiesen werden konnten, zur Freisetzung von IL-4, welches wiederum die Bildung von IL-1 β und IL-6 und damit letztendlich die Proliferation von Th17-Zellen hemmt.

Diese *in vivo* in der Maus erhobenen Befunde lassen sich wahrscheinlich *in vitro* im humanen System nachstellen, wenn zusätzlich naive Th-Zellen in das etablierte Kokultursystem aus LPS-stimulierten Monozyten in Gegenwart von IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen eingebracht werden und das Zytokinprofil der Th-Zellen bestimmt wird.

5.3.2 Monozyten entwickeln sich in Gegenwart von IL-4 zu M2-Makrophagen

Im Blut zirkulierende unreife Monozyten werden unter dem Einfluss von Pathogenen in das Gewebe rekrutiert und differenzieren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen [9, 43, 120]. Dabei werden sie abhängig vom vorherrschenden Zytokinprofil auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert und können anhand ihres Phänotyps unterschieden werden [14, 45, 84, 86].

Klassisch aktivierte Makrophagen (CAM oder M1-Makrophagen) sind Immunzellen mit einem akut proinflammatorischen Phänotyp, die höchst aggressiv gegen Pathogene vorgehen und große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen produzieren. Sie werden in Gegenwart von bakteriellen Bestandteilen, wie z. B. LPS, und dem Th1-Zytokin IFN- γ generiert.

Alternativ aktivierte Makrophagen (AAM oder M2-Makrophagen) mit ihrem antiinflammatorischen Phänotyp dagegen hemmen die Zytokinsekretion des

klassischen Aktivierungsweges und sind beteiligt an der Regulation der Immunantwort, der Aufrechterhaltung von Toleranz, der Gewebereparatur bzw. Wundheilung und ferner dem Schutz vor parasitären Infektionen [69, 80, 86]. Sie entstehen unter dem Einfluss der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13.

Erstaunlicherweise weisen die Makrophagen dabei eine große Plastizität auf: M2-polarisierte Makrophagen können sich in klassisch aktivierte inflammatorische Makrophagen umwandeln [85] und inflammatorische Makrophagen können – wie erst kürzlich beschrieben wurde – über IL-4, das von basophilen Granulozyten freigesetzt wird, in antiinflammatorische AAM differenzieren [30, 65].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LPS-stimulierte Monozyten sowohl in Gegenwart von rekombinantem IL-4 als auch tendenziell in der Kokultur mit IPSE/alpha-1-stimulierten Basophilen einen M2-typischen Phänotyp ausbilden. Dies zeigt sich in einer erhöhten Oberflächenexpression von CD206 und CD 209. Zwar war es mir im Rahmen der Doktorarbeit nicht mehr möglich, das letztgenannte Experiment mit längerer Kulturdauer zu wiederholen und dann die Expressionsmuster von CD14, CD206 und CD209 zu verschiedenen Zeitpunkten (z. B. 24, 48 und 120 Stunden) zu analysieren, es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine längere Versuchsdauer in Kombination mit einer stärkeren Freisetzung von IL-4 aus Basophilen nach Stimulation durch LPS und IPSE/alpha-1 zu einer stärkeren Expression von CD206 und CD209 und somit zu einer ausgeprägteren M2-Polarisierung der LPS-stimulierten Monozyten führen würden.

5.3.3 Die Rolle der von Basophilen sezernierten Zytokine in der durch IPSE/alpha-1 vermittelten antiinflammatorischen Reaktion

IPSE/alpha-1 stimuliert basophile Granulozyten zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 [108]. Für beide Interleukine ist beschrieben, dass sie die Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten hemmen [142, 143]. Während für IL-4 *in vitro* eindeutig gezeigt werden konnte, dass es an der Vermittlung der antiinflammatorischen Wirkung von IPSE/alpha-1 beteiligt ist, scheint ebenfalls aus den Basophilen freigesetztes IL-13 von geringerer Bedeutung zu sein.

Zwar wurde beim Einsatz von rekombinantem humanen IL-13 in der Zellkultur mit LPS-stimulierten Monozyten in der Tat eine Hemmung der LPS-induzierten IL-6 Freisetzung aus Monozyten beobachtet – allerdings erst ab einer eingesetzten Konzentration von 1,2 ng/ml (siehe Abbildung 4.7, Seite 43). Dies entspricht der zehnfachen Menge des in der *in vitro*-Kultur durchschnittlich aus Basophilen freigesetzten IL-13 (siehe Abbildung 4.8, Seite 44). Damit ist basophiles IL-13 in der Kokultur mit IPSE/alpha-1-aktivierten Basophilen vermutlich nicht an der beobachteten Inhibierung der proinflammatorischen Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten beteiligt. So konnte durch Neutralisation von IL-13 mittels eines anti-humanen IL-13 Antikörpers die inhibierende Wirkung IPSE/alpha-1-aktivierter Basophiler auf die IL-6 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten nicht verändert werden (siehe Abbildung 4.8, Seite 44). Mit anderen Worten IL-13 scheint an diesem Szenario nicht beteiligt zu sein.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die *in vitro*-Kultur ein artifizielles System ist. In früheren Untersuchungen der FG konnte gezeigt werden, dass Unterschie-

de in der IL-13 Freisetzung aus *in vitro*-kultivierten Basophilen dann besonders gut zu detektieren sind, wenn dem Zellkulturmedium rekombinantes humanes IL-3 – ein wichtiger Wachstums-, Differenzierungs- und Aktivierungsfaktor für Basophile [114, 121] – in einer Konzentration von 0,2 ng/ml zugesetzt wird. Bei allen Kokultorexperimenten waren aber 2,5 ng/ml IL-3 dem Medium zugesetzt worden (siehe Abschnitt 2.3.1.2, Seite 16), da sich letztere in früheren Experimenten der FG als optimal für den Nachweis von IL-4 gezeigt hatte.

Es ist somit zu erwarten, dass die durch IPSE/alpha-1 vermittelte anti-inflammatorische Reaktion *in vivo* nicht allein durch basophiles IL-4 induziert wird, auch wenn sich die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Monozyten durch IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile *in vitro* zwar durch einen anti-humanen IL-4-, nicht aber durch einen anti-humanen IL-13-Antikörper aufheben ließ. In der Kokultur ist eine Überstimulation der Basophilen in Gegenwart höherer IL-3 Konzentrationen denkbar, so dass ihre Stimulation mit LPS und IPSE/alpha-1 nur von einer geringen IL-13 Freisetzung begleitet ist. Vielleicht mag sogar diese geringe Menge IL-13 *in vivo* ausreichen, um Monozyten in direkter Nachbarschaft von Basophilen in ihrer proinflammatorischen Zytokinfreisetzung zu hemmen. Dies kann jedoch *in vitro* so nicht nachgestellt werden.

5.4 Die IPSE/alpha-1 vermittelte Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung erfolgt zellkontaktunabhängig

Abschließend geklärt werden konnte im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob es einer direkten Zell-Zell-Interaktion bedarf, um die Hemmung der proinflammatorischen Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten durch IPSE/alpha-1-aktivierte Basophile zu induzieren oder ob allein von den Basophilen sezerniertes IL-4 ausreichend ist.

Dass allein auch der Zusatz von rekombinantem IL-4 zu LPS-stimulierten Monozyten deren Aktivierung und Zytokinfreisetzung senkt, ist bereits ein gutes Indiz dafür, dass es keiner Zell-Zell-Interaktion bedarf. Die Experimente, bei denen Monozyten und basophile Granulozyten durch Einsatz eines Membraneinsatzes räumlich voneinander getrennt werden sollten, waren nicht aufschlussreich. Entweder war der Porendurchmesser zu klein (0,4 und 1 µm), so dass Zytokine, IPSE/alpha-1 und LPS nicht frei diffundieren konnten und damit in Wirkung stark beeinträchtigt waren, oder aber der Porendurchmesser war zu groß (3 und 8 µm), so dass basophile Granulozyten zu den Monozyten wandern konnten. Womit sie ihre Fähigkeit zur Rekrutierung in ein entzündliches Milieu unfreiwillig unter Beweis gestellt haben.

Erst die separate Gabe von Basophilen-Überstand, der nach 6stündiger Kultur von Basophilen in Gegenwart von LPS und IPSE/alpha-1 gewonnen worden war, konnte zeigen, dass allein aus Basophilen sezerniertes IL-4 genügt, um die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung aus Monozyten zu hemmen (siehe Abbildung 4.15, Seite 53). Erstaunlicherweise wurde nicht nur die IL-6 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten bei gleichzeitiger Verabreichung von LPS und Basophilen-Überstand zu den Monozyten gehemmt, sondern es konnte auch die IL-6 Freisetzung aus Monozyten, die bereits 6 Stunden lang mit LPS stimuliert worden waren, inhibiert werden.

Zusammengefasst heißt dies: In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der von *S. mansoni*-Eiern sekretierte Faktor IPSE/alpha-1 antiinflammatorisch wirksam und an der Regulation der durch die Eier des Parasiten ausgelösten Entzündung beteiligt ist. Basophile Granulozyten wandern in das Granulom um *S. mansoni*-Eier ein. Sie sezernieren IL-4, dessen Freisetzung durch die gleichzeitige Stimulation von FcεRI (via IPSE/alpha-1) und TLR4 (via LPS) in einem höchst inflammatorischen Umfeld – ausgelöst durch die Granulombildung und Wanderung der Schistosomen-Eier durch die Darmwand in das intestinale Lumen – synergistisch erhöht wird. So wird *in vitro* indirekt über die Aktivierung Basophiler und die dadurch induzierte Freisetzung von IL-4 die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten Monozyten bzw. PBMC gehemmt. Ferner entwickeln die inflammatorischen Monozyten in Gegenwart der aktivierten Basophilen einen M2-typischen antiinflammatorischen Phänotyp (siehe Abbildung 5.1, Seite 71).

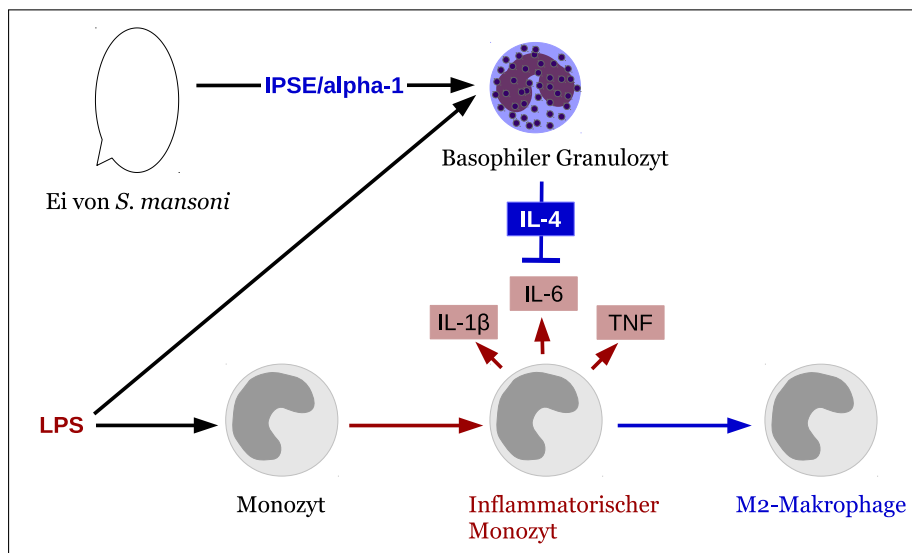


Abbildung 5.1: Synergistisch durch IPSE/alpha-1 und LPS aktivierte Basophile regulieren Entzündungen und führen zur Differenzierung inflammatorischer Monozyten in M2-Makrophagen.

Das alles ist dem Parasiten von Nutzen. In einem immunologisch höchst aktiven Gewebe generiert er eine antiinflammatorische Nische und stellt so sein langjähriges Überleben in einem zwar beeinträchtigtem, aber nicht unmittelbar lebensbedrohten Wirt sicher.

5.5 Ausblick

Bis heute sind die genauen molekularen Vorgänge der Immunmodulation durch parasitäre Würmer nicht erschöpfend geklärt. Dennoch gibt es eine zunehmende Anzahl an Indizien dafür, dass sie in Zukunft eine Quelle für wirksame Präparate zur Therapie atopischer Erkrankungen, z. B. allergischer Rhinitis und Asthma,

sowie Autoimmunerkrankungen, wie M. Crohn, darstellen werden [19, 31, 70, 77, 91, 92, 106, 119, 122, 145, 151, 153].

Wenig ist darüber bekannt, welchen Einfluss speziell basophile Granulozyten und ihre Zytokine auf den Mechanismus einer erfolgreichen Immuntherapie besitzen. Jedoch rücken die Basophilen mit ihrem Zytokinprofil immer mehr in das Blickfeld immunologischer und allergologischer Forschung. Insbesondere stellt sich die Frage, inwieweit sich die Freisetzung von IL-4 (und IL-13) aus Basophilen bei allergischen Patienten nach eingeleiteter Immuntherapie verändert.

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass die beiden von aktivierten Basophilen freigesetzten Interleukine-4 und -13 nicht nur im Zuge einer Helmintheninfektion eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen übernehmen [30, 64, 65, 118, 93, 145]. Sie inhibieren die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch LPS-aktivierte Monozyten [82, 105, 136, 142], wie es in dieser Arbeit am Beispiel von PBMC für IL-4 gezeigt werden konnte. Damit unterdrücken sie wichtige Zytokine (IL-1 β , IL-6 u. a.), welche die Entwicklung von Th17-Zellen fördern und so eine proinflammatorische Immunantwort induzieren [2]. Ferner wird der entzündungshemmende Effekt von IL-4 durch die Induktion von AAM verstärkt [30, 80], in dieser Arbeit ebenfalls für basophiles IL-4 gezeigt.

Die bisherigen Untersuchungen an dem von den Eiern des parasitischen Helminthen *S. mansoni* sekretierten Faktor IPSE/alpha-1 geben eindeutige Hinweise auf dessen spezifische immunmodulierende Wirkung (zugunsten des Parasiten). IPSE/alpha-1 ist damit ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines standardisierten Medikaments zur gezielten (lokalen) Therapie von Entzündungsreaktionen. Es könnte als einzelnes, rekombinant hergestelltes und appliziertes Protein das Immunsystem vergleichbar einer Wurminfektion modulieren, ohne jedoch die unangenehmen bis hin zu gesundheitsschädlichen Begleiterscheinungen einer Wurminfektion zu induzieren. Trotz der entzündungshemmenden Wirkung einer Wurmtherapie sind eine Vielzahl von Nebenwirkungen beschrieben, welche von Übelkeit und Durchfall über Eisenmangelanämien (bei prädisponierten Patienten) bis hin zu Schädigungen von Leber und der Induktion von Blasenkrebs reichen. Nicht zu unterschätzen ist zudem die psychologische Barriere gegenüber einer willentlich eingesetzten Wurminfektion. Auch könnte das Immunsystem der Patienten zusätzlich geschwächt und diese so noch anfälliger für Infektionskrankheiten werden, was gerade bei Kindern und älteren Menschen ein nicht zu vernachlässigendes Risiko darstellen dürfte. Die Verabreichung einzelner, immunmodulatorisch wirkender Wurmkomponenten könnte den Weg zu einer sichereren Therapie immunologischer Erkrankungen unter Einbeziehung der natürlichen Immunreaktion des Wirts eröffnen.

Literaturverzeichnis

- [1] Abehsira-Amar O., Gibert M., Jolij M., Thèze J., Jankovic D.L.: IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *Journal of Immunology* 1992; 148(12): 3820–3829.
- [2] Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F.: Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology* 2007; 8(9): 942–949.
- [3] Allen J.E., Maizels R.M.: Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews. Immunology* 2011; 11(6): 375–388.
- [4] Anyan W.K., Seki T., Kumagai T., Obata-Ninomiya K., Furushima-Shimogawara R., Kwansa-Bentum B., Akao N., Bosompem K.M., Boakye D.A., Wilson M.D., Karasuyama H., Ohta N.: Basophil depletion down-regulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitology international* 2013; 62(6): 508–513.
- [5] Arock M., Schneider E., Boissan M., Tricottet V., Dy M.: Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 71(4): 557–564.
- [6] Asher M.I., Montefort S., Björkstén B., Lai C.K., Strachan D.P., Weiland S.K., Williams H.: Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 2006; 368(9537): 733–743.
- [7] Ashton P.D., Harrop R., Shah B., Wilson R.A.: The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology* 2001; 122(Pt 3): 329–338.
- [8] Astarie-Dequeker C., N'Diaye E.N., Le Cabec V., Rittig M.G., Prandi J., Maridonneau-Parini I.: The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infection and Immunity* 1999; 67(2): 469–477.
- [9] Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumanò A., Lauvau G., Geissmann F.: Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 2007; 317(5838): 666–670.

- [10] Bach J.F.: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347(12): 911–920.
- [11] Barreiro L.B., Quintana-Murci L.: From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nature reviews. Genetics* 2010; 11(1): 17–30.
- [12] Beasley R.: Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet* 1998; 351(9111): 1225–1232.
- [13] Bieneman A.P., Chichester K.L., Chen Y.H., Schroeder J.T.: Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115(2): 295–301.
- [14] Biswas S.K., Mantovani A.: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 2010; 11(10): 889–896.
- [15] Bochner B.S., McKelvey A.A., Sterbinsky S.A., Hildreth J.E., Derse C.P., Klunk D.A., Lichtenstein L.M., Schleimer R.P.: IL-3 augments adhesiveness for endothelium and CD11b expression in human basophils but not neutrophils. *Journal of Immunology* 1990; 145(6): 1832–1837.
- [16] Brunet L.R., Finkelman F.D., Cheever A.W., Kopf M.A., Pearce E.J.: IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology* 1997; 159(2): 777–785.
- [17] Brunner T., Heusser C.H., Dahinden C.A.: Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 177(3): 605–611.
- [18] Bühring H.J., Simmons P.J., Pudney M., Müller R., Jarrossay D., Agthoven A.v., Willheim M., Brugger W., Valent P., Kanz L.: The Monoclonal Antibody 97A6 Defines a Novel Surface Antigen Expressed on Human Basophils and Their Multipotent and Unipotent Progenitors. *Blood* 1999; 94(7): 2343–2356.
- [19] Cooke A., Tonks P., Jones F.M., O’Shea H., Hutchings P., Fulford A.J., Dunne D.W.: Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology* 1999; 21(4): 169–176.
- [20] Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M.: IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *Journal of Immunology* 2008; 180(9): 5771–5777.
- [21] Croese J., O’Neil J., Masson J., Cooke S., Melrose W., Pritchard D., Speare R.: A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn’s patients and reservoir donors. *Gut* 2006; 55(1): 136–137.

- [22] Damian R.T.: Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 1997; 115 Suppl: 169–175.
- [23] DeFranco A.L., Locksley R.M., Robertson M.: *Immunity: the immune response in infectious and inflammatory disease*. New Science Press, London; Sunderland, MA, 2007. ISBN 978-0199206148.
- [24] Dixon H., Blanchard C., deSchoolmeester M., Yuill N., Christie J., Rothenberg M., Else K.: The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *European Journal of Immunology* 2006; 36(7): 1753–1763.
- [25] Duez C., Gosset P., Tonnel A.B.: Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *European journal of dermatology* 2006; 16(1): 12–16.
- [26] Dunne D.W., Cooke A.: A worm’s eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews. Immunology* 2005; 5(5): 420–426.
- [27] Dunne D.W., Jones F.M., Doenhoff M.J.: The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology* 1991; 103(2): 225–236.
- [28] Dvorak A.M.: The mouse basophil, a rare and rarely recognized granulocyte. *Blood* 2000-08-15; 96(4): 1616–1617.
- [29] Díaz A., Allen J.E.: Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *European Journal of Immunology* 2007; 37(12): 3319–3326.
- [30] Egawa M., Mukai K., Yoshikawa S., Iki M., Mukaida N., Kawano Y., Minogishi Y., Karasuyama H.: Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 2013; 38(3): 570–580.
- [31] Elliott D.E., Weinstock J.V.: Helminthic therapy: using worms to treat immune-mediated disease. *Advances in experimental medicine and biology* 2009; 666: 157–166.
- [32] Elliott D.E., Weinstock J.V.: Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012; 1247: 83–96.
- [33] Everts B., Perona-Wright G., Smits H.H., Hokke C.H., van der Ham A.J., Fitzsimmons C.M., Doenhoff M.J., van der Bosch J., Mohrs K., Haas H., Mohrs M., Yazdanbakhsh M., Schramm G.: Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(8): 1673–1680.
- [34] Falcone F.H., Dahinden C.A., Gibbs B.F., Noll T., Amon U., Hebestreit H., Abrahamsen O., Klaucke J., Schlaak M., Haas H.: Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *European Journal of Immunology* 1996; 26(5): 1147–1155.

- [35] Fallon P.G., Richardson E.J., McKenzie G.J., McKenzie A.N.J.: Schistosome Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. *Journal of Immunology* 2000; 164(5): 2585–2591.
- [36] Fallon P.G., Smith P., Dunne D.W.: Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *European Journal of Immunology* 1998; 28(4): 1408–1416.
- [37] Fiorentino D., Zlotnik A., Mosmann T., Howard M., O’Garra A.: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology* 1991; 147(11): 3815–3822.
- [38] Flohr C., Quinnell R.J., Britton J.: Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clinical & Experimental Allergy* 2009; 39(1): 20–32.
- [39] Fumagalli M., Pozzoli U., Cagliani R., Comi G.P., Riva S., Clerici M., Bresolin N., Sironi M.: Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(6): 1395–1408.
- [40] Gale E.A.M.: The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. *Diabetes* 2002; 51(12): 3353–3361.
- [41] Gauvreau G.M., Lee J.M., Watson R.M., Irani A.M., Schwartz L.B., O’Byrne P.M.: Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161(5): 1473–1478.
- [42] Geijtenbeek T.B.H., Torensma R., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C.F., Adema G.J., van Kooyk Y., Figdor C.G.: Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 2000; 100(5): 575–585.
- [43] Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K.: Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 2010; 327(5966): 656–661.
- [44] Gibbs B.F., Haas H., Falcone F.H., Albrecht C., Vollrath I.B., Noll T., Wolff H.H., Amon U.: Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *European Journal of Immunology* 1996; 26(10): 2493–2498.
- [45] Gordon S., Taylor P.R.: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology* 2005; 5(12): 953–964.
- [46] Grassl G.A., Valdez Y., Bergstrom K.S., Vallance B.A., Finlay B.B.: Chronic Enteric Salmonella Infection in Mice Leads to Severe and Persistent Intestinal Fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134(3): 768–780.e2.

- [47] Guo C.B., Liu M.C., Galli S.J., Bochner B.S., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M.: Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1994; 10(4): 384–390.
- [48] Haisch K., Gibbs B.F., Körber H., Ernst M., Grage-Griebenow E., Schlaak M., Haas H.: Purification of morphologically and functionally intact human basophils to near homogeneity. *Journal of Immunological Methods* 1999; 226(1-2): 129–137.
- [49] Haisch K., Schramm G., Falcone F.H., Alexander C., Schlaak M., Haas H.: A glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs binds non-antigen-specific immunoglobulin E and releases interleukin-4 from human basophils. *Parasite Immunology* 2001; 23(8): 427–434.
- [50] Hams E., Aviello G., Fallon P.G.: The *Schistosoma* Granuloma: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology* 2013; 4(89): 1–8.
- [51] Herbert D.R., Hölscher C., Mohrs M., Arendse B., Schwegmann A., Radwanska M., Leeto M., Kirsch R., Hall P., Mossmann H., Claussen B., Förster I., Brombacher F.: Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. *Immunity* 2004; 20(5): 623–635.
- [52] Herbert D.R., Orekov T., Perkins C., Rothenberg M.E., Finkelman F.D.: IL-4R α Expression by Bone Marrow-Derived Cells Is Necessary and Sufficient for Host Protection against Acute Schistosomiasis. *Journal of Immunology* 2008; 180(7): 4948–4955.
- [53] Hesse M., Piccirillo C.A., Belkaid Y., Prufer J., Mentink-Kane M., Leusink M., Cheever A.W., Shevach E.M., Wynn T.A.: The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* 2004; 172(5): 3157–3166.
- [54] Hotez P.J., Bethony J.M., Diemert D.J., Pearson M., Loukas A.: Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nature Reviews. Microbiology* 2010; 8(11): 814–826.
- [55] Hotez P.J., Brindley P.J., Bethony J.M., King C.H., Pearce E.J., Jacobson J.: Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(4): 1311–1321.
- [56] Iikura M., Ebisawa M., Yamaguchi M., Tachimoto H., Ohta K., Yamamoto K., Hirai K.: Transendothelial Migration of Human Basophils. *Journal of Immunology* 2004; 173(8): 5189–5195.
- [57] Iliopoulos O., Baroody F.M., Naclerio R.M., Bochner B.S., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M.: Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *Journal of Immunology* 1992; 148(7): 2223–2228.
- [58] Irani A.M., Huang C., Xia H.Z., Kepley C., Nafie A., Fouda E.D., Craig S., Zweiman B., Schwartz L.B.: Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 101(3): 354–362.

- [59] Jackson J.A., Friberg I.M., Little S., Bradley J.E.: Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 2009; 126(1): 18–27.
- [60] Jankovic D., Cheever A.W., Kullberg M.C., Wynn T.A., Yap G., Caspar P., Lewis F.A., Clynes R., Ravetch J.V., Sher A.: CD4+ T Cell-mediated Granulomatous Pathology in Schistosomiasis Is Downregulated by a B Cell-dependent Mechanism Requiring Fc Receptor Signaling. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187(4): 619–629.
- [61] Jurberg A.D., Gonçalves T., Costa T.A., de Mattos A.C.A., Pascarelli B.M., de Manso P.P.A., Ribeiro-Alves M., Pelajo-Machado M., Peralta J.M., Coelho P.M.Z., Lenzi H.L.: The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Development Genes and Evolution* 2009; 219(5): 219–234.
- [62] Karasuyama H., Mukai K., Obata K., Tsujimura Y., Wada T.: Nonredundant Roles of Basophils in Immunity. *Annual Review of Immunology* 2011; 29(1): 45–69.
- [63] Karasuyama H., Mukai K., Tsujimura Y., Obata K.: Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews. Immunology* 2009; 9(1): 9–13.
- [64] Karasuyama H., Wada T., Yoshikawa S., Obata K.: Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites. *Trends in Immunology* 2011; 32(3): 125–130.
- [65] Karp C.L., Murray P.J.: Non-Canonical Alternatives: What a Macrophage Is 4. *Journal of Experimental Medicine* 2012; 209(3): 427–431.
- [66] Kawai T., Akira S.: Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 2011; 34(5): 637–650.
- [67] Khan A.R., Fallon P.G.: Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns. *International journal for parasitology* 2013; 43(3-4): 293–299.
- [68] Komiya A., Nagase H., Okugawa S., Ota Y., Suzukawa M., Kawakami A., Sekiya T., Matsushima K., Ohta K., Hirai K., Yamamoto K., Yamaguchi M.: Expression and function of toll-like receptors in human basophils. *International Archives of Allergy and Immunology* 2006; 140(Suppl 1): 23–27.
- [69] Kreider T., Anthony R.M., Urban Joseph F J., Gause W.C.: Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology* 2007; 19(4): 448–453.
- [70] La Flamme A.C., Ruddenklau K., Bäckström B.T.: Schistosomiasis Decreases Central Nervous System Inflammation and Alters the Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Infection and Immunity* 2003; 71(9): 4996–5004.

- [71] Lenzi H.L., Kimmel E., Schechtman H., Pelajo-Machado M., Romanha W.S., Pacheco R.G., Mariano M., Lenzi J.A.: Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 1998; 93(Suppl 1): 141–151.
- [72] Leulier F., Lemaitre B.: Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nature Reviews. Genetics* 2008; 9(3): 165–178.
- [73] Li H., Sim T., Alam R.: IL-13 released by and localized in human basophils. *Journal of Immunology* 1996; 156(12): 4833–4838.
- [74] López-Bravo M., Minguito de la Escalera M., Domínguez P.M., González-Cintado L., del Fresno C., Martín P., Martínez del Hoyo G., Ardavin C.: IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 132(6): 1409–1419.e13.
- [75] Maizels R.M., Holland M.J.: Parasite immunity: Pathways for expelling intestinal helminths. *Current Biology* 1998; 8(20): 711–714.
- [76] Makepeace B., Martin C., Turner J., Specht S.: Granulocytes in Helminth Infection - Who is Calling the Shots? *Current Medicinal Chemistry* 2012; 19(10): 1567–1586.
- [77] Mangan N.E., Rooijen N.v., McKenzie A.N.J., Fallon P.G.: Helminth-Modified Pulmonary Immune Response Protects Mice from Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness. *Journal of Immunology* 2006; 176(1): 138–147.
- [78] Mansy S.S.: Cellular constituent and intercellular adhesion in *Schistosoma mansoni* granuloma: an ultrastructural study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 1998; 28(1): 169–181.
- [79] Martinez F.O., Gordon S., Locati M., Mantovani A.: Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *Journal of Immunology* 2006; 177(10): 7303–7311.
- [80] Martinez F.O., Helming L., Gordon S.: Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology* 2009; 27(1): 451–483.
- [81] Mathieson W., Wilson R.A.: A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International Journal for Parasitology* 2010; 40(5): 617–628.
- [82] Minty A., Chalon P., Derocq J.M., Dumont X., Guillemot J.C., Kaghad M., Labit C., Leplat P., Liauzun P., Miloux B., Minty C., Casellas P., Loison G., Lupker J., Shire D., Ferrara P., Caput D.: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993; 362(6417): 248–250.

- [83] Moore D.L., Grove D.I., Warren K.S.: The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: Quantitation of cell populations. *Journal of Pathology* 1977; 121(1): 41–50.
- [84] Mosser D.M., Edwards J.P.: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology* 2008; 8(12): 958–969.
- [85] Murray P.J., Wynn T.A.: Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89(4): 557–563.
- [86] Murray P.J., Wynn T.A.: Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology* 2011; 11(11): 723–737.
- [87] Obiri N.I., Debinski W., Leonard W.J., Puri R.K.: Receptor for Interleukin 13 INTERACTION WITH INTERLEUKIN 4 BY A MECHANISM THAT DOES NOT INVOLVE THE COMMON γ CHAIN SHARED BY RECEPTORS FOR INTERLEUKINS 2, 4, 7, 9, AND 15. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(15): 8797–8804.
- [88] Ohnmacht C., Voehringer D.: Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 2009; 113(12): 2816–2825.
- [89] Okada H., Kuhn C., Feillet H., Bach J.F.: The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology* 2010; 160(1): 1–9.
- [90] Olivera A., Rivera J.: Paradigm shifts in mast cell and basophil biology and function: an emerging view of immune regulation in health and disease. *Methods in Molecular Biology* 2014; 1192: 3–31.
- [91] Osada Y., Shimizu S., Kumagai T., Yamada S., Kanazawa T.: *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *International Journal for Parasitology* 2009; 39(4): 457–464.
- [92] Pacífico L.G.G., Marinho F.A.V., Fonseca C.T., Barsante M.M., Pinho V., Sales-Junior P.A., Cardoso L.S., Araújo M.I., Carvalho E.M., Cassali G.D., Teixeira M.M., Oliveira S.C.: *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. *Infection and Immunity* 2009; 77(1): 98–107.
- [93] van Panhuys N., Prout M., Forbes E., Min B., Paul W.E., Le Gros G.: Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *Journal of Immunology* 2011; 186(5): 2719–2728.
- [94] Park J.S., Gamboni-Robertson F., He Q., Svetkauskaite D., Kim J.Y., Strassheim D., Sohn J.W., Yamada S., Maruyama I., Banerjee A., Ishizaka A., Abraham E.: High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American Journal of Physiology* 2006; 290(3): C917–C924.

- [95] Patki A.: Eat dirt and avoid atopy: The hygiene hypothesis revisited. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology 2007; 73(1): 2.
- [96] Pearce E.J., M Kane C., Sun J., J Taylor J., McKee A.S., Cervi L.: Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. Immunological Reviews 2004; 201: 117–126.
- [97] Pearce E.J., MacDonald A.S.: The immunobiology of schistosomiasis. Nature Reviews. Immunology 2002; 2(7): 499–511.
- [98] Pearce E.J., Sher A.: Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. Contributions to Microbiology and Immunology 1987; 8: 219–232.
- [99] Pejler G., Rönnberg E., Waern I., Wernersson S.: Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. Blood 2010; 115(24): 4981–4990.
- [100] Perrigoue J.G., Saenz S.A., Siracusa M.C., Allenspach E.J., Taylor B.C., Giacomini P.R., Nair M.G., Du Y., Zaph C., van Rooijen N., Comeau M.R., Pearce E.J., Laufer T.M., Artis D.: MHC class II-dependent basophil-CD4⁺ T cell interactions promote TH2 cytokine-dependent immunity. Nature Immunology 2009; 10(7): 697–705.
- [101] Pesce J.T., Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasmi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., Wynn T.A.: Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. PLoS Pathogens 2009; 5(4): e1000371.
- [102] Pilling D., Fan T., Huang D., Kaul B., Gomer R.H.: Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts. PLoS ONE 2009; 4(10): e7475.
- [103] Pritchard D.: Worm therapy: for or against? Journal of Helminthology 2011; 85(3): 225–227.
- [104] Pugliatti M., Sotgiu S., Rosati G.: The worldwide prevalence of multiple sclerosis. Clinical Neurology and Neurosurgery 2002; 104(3): 182–191.
- [105] Rivellese F., Suurmond J., de Paulis A., Marone G., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M.: IgE and IL-33-mediated triggering of human basophils inhibits TLR4-induced monocyte activation. European Journal of Immunology 2014; 44(10): 3045–3055.
- [106] Ruyssers N.E., De Winter B.Y., De Man J.G., Loukas A., Pearson M.S., Weinstock J.V., Van den Bossche R.M., Martinet W., Pelckmans P.A., Moreels T.G.: Therapeutic potential of helminth soluble proteins in TNBS-induced colitis in mice. Inflammatory Bowel Diseases 2009; 15(4): 491–500.
- [107] Schmidt G.D., Roberts L.S., Jr J.J.: Foundations of Parasitology. McGraw Hill Higher Education, 2000, international 2 revised ed edition. ISBN 0071168966.

- [108] Schramm G., Falcone F.H., Gronow A., Haisch K., Mamat U., Doenhoff M.J., Oliveira G., Galle J., Dahinden C.A., Haas H.: Molecular Characterization of an Interleukin-4-inducing Factor from *Schistosoma mansoni* Eggs. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(20): 18384–18392.
- [109] Schramm G., Gronow A., Knobloch J., Wipperfsteg V., Grevelding C.G., Galle J., Fuller H., Stanley R.G., Chiodini P.L., Haas H., Doenhoff M.J.: IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2006; 147(1): 9–19.
- [110] Schramm G., Haas H.: Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes and Infection* 2010; 12(12–13): 881–888.
- [111] Schramm G., Hamilton J.V., Balog C.I.A., Wuhler M., Gronow A., Beckmann S., Wipperfsteg V., Grevelding C.G., Goldmann T., Weber E., Brattig N.W., Deelder A.M., Dunne D.W., Hokke C.H., Haas H., Doenhoff M.J.: Molecular characterisation of kappa-5, a major antigenic glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2009; 166(1): 4–14.
- [112] Schramm G., Mohrs K., Wodrich M., Doenhoff M.J., Pearce E.J., Haas H., Mohrs M.: Cutting Edge: IPSE/alpha-1, a Glycoprotein from *Schistosoma mansoni* Eggs, Induces IgE-Dependent, Antigen-Independent IL-4 Production by Murine Basophils In Vivo. *Journal of Immunology* 2007; 178(10): 6023–6027.
- [113] Schroeder J.T.: Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Advances in Immunology* 2009; 101: 123–161.
- [114] Schroeder J.T.: Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunological Reviews* 2011; 242(1): 144–160.
- [115] Schroeder J.T., MacGlashan D.W., Lichtenstein L.M.: Human basophils: mediator release and cytokine production. *Advances in Immunology* 2001; 77: 93–122.
- [116] Schwartz C., Oeser K., Prazeres da Costa C., Layland L.E., Voehringer D.: T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *Journal of Immunology* 2014; 193(7): 3590–3599.
- [117] Schölmerich J., Fellermann K., Seibold F., Rogler G., Langhorst J., Howaldt S., Novacek G., Petersen A., Bachmann O., Matthes H., Hesselbarth N., Klugmann T., Wehkamp J. and Klaus J., Ott C., Dilger K., Greinwald R., Mueller R.: Efficacy and Safety of Trichuris Suis Ova (TSO) for Treatment of Mildly-to-Moderately Active Crohn’s Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *United European Gastroenterology Journal* 2014; 1S(2): A1–A131 Abstract for Oral Presentation 392.
- [118] Semnani R.T., Mahapatra L., Moore V., Sanprasert V., Nutman T.B.: Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by interleukin-4 or the parasitic nematode *Brugia malayi*. *Infection and immunity* 2011; 79(10): 3957–3965.

- [119] Sewell D., Qing Z., Reinke E., Elliot D., Weinstock J., Sandor M., Fabry Z.: Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology* 2003; 15(1): 59–69.
- [120] Shi C., Pamer E.G.: Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology* 2011; 11(11): 762–774.
- [121] Siracusa M.C., Perrigoue J.G., Comeau M.R., Artis D.: New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunology & Cell Biology* 2010; 88(3): 275–284.
- [122] Smits H.H., Hammad H., van Nimwegen M., Soullie T., Willart M.A., Lievers E., Kadouch J., Kool M., Kos-van Oosterhoud J., Deelder A.M., Lambrecht B.N., Yazdanbakhsh M.: Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 120(4): 932–940.
- [123] Strachan D.P.: Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 1989; 299(6710): 1259–1260.
- [124] Sullivan B.M., Locksley R.M.: Basophils: a nonredundant contributor to host immunity. *Immunity* 2009; 30(1): 12–20.
- [125] Summers R.W., Elliott D.E., Urban J.F., Thompson R., Weinstock J.V.: *Trichuris suis* therapy in Crohn’s disease. *Gut* 2005; 54(1): 87–90.
- [126] Summers R.W., Elliott D.E., Urban J.F., Thompson R.A., Weinstock J.V.: *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005; 128(4): 825–832.
- [127] Suurmond J., Stoop J.N., Rivellese F., Bakker A.M., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M.: Activation of human basophils by combined toll-like receptor- and FcεRI-triggering can promote Th2 skewing of naive T helper cells. *European Journal of Immunology* 2014; 44(2): 386–396.
- [128] Suzukawa M., Nagase H., Ogahara I., Han K., Tashimo H., Shibui A., Koketsu R., Nakae S., Yamaguchi M., Ohta K.: Leptin Enhances Survival and Induces Migration, Degranulation, and Cytokine Synthesis of Human Basophils. *Journal of Immunology* 2011; 186(9): 5254–5260.
- [129] Takiya C.M., Guerret S., Porto L.C., Grimaud J.A.: Morphological and morphometrical analysis of schistosomal granuloma degradation. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1993; 45(2): 121–128.
- [130] Thomas C.J., Kapoor M., Sharma S., Bausinger H., Zyilan U., Lipsker D., Hanau D., Surolia A.: Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Letters* 2002; 531(2): 184–188.
- [131] Thomas P.G., Carter M.R., Da’dara A.A., DeSimone T.M., Harn D.A.: A Helminth Glycan Induces APC Maturation via Alternative NF-κB Activation Independent of IκBα Degradation. *Journal of Immunology* 2005; 175(4): 2082–2090.

- [132] Turner J.D., Narang P., Coles M.C., Mountford A.P.: Blood Flukes Exploit Peyer's Patch Lymphoid Tissue to Facilitate Transmission from the Mammalian Host. *PLoS Pathogens* 2012; 8(12).
- [133] Ugajin T., Kojima T., Mukai K., Obata K., Kawano Y., Minegishi Y., Eishi Y., Yokozeki H., Karasuyama H.: Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 86(6): 1417–1425.
- [134] Uguccioni M., Mackay C.R., Ochensberger B., Loetscher P., Rhis S., La-Rosa G.J., Rao P., Ponath P.D., Baggiolini M., Dahinden C.A.: High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100(5): 1137–1143.
- [135] Urbina C., Ortiz C., Hurtado I.: A new look at basophils in mice. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 1981; 66(2): 158–160.
- [136] te Velde A.A., Huijbens R.J., Heije K., de Vries J.E., Figdor C.G.: Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 β , tumor necrosis factor α , and IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990; 76(7): 1392–1397.
- [137] te Velde A.A., Klomp J.P., Yard B.A., de Vries J.E., Figdor C.G.: Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4. *Journal of Immunology* 1988; 140(5): 1548–1554.
- [138] Voehringer D.: Basophils in allergic immune responses. *Current Opinion in Immunology* 2011; 23(6): 789–793.
- [139] Voehringer D.: Basophils in immune responses against helminths. *Microbes and Infection* 2011; 13(11): 881–887.
- [140] de Vries J.E.: The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 102(2): 165–169.
- [141] de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E.: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1991; 174(5): 1209–1220.
- [142] de Waal Malefyt R., Figdor C.G., Huijbens R., Mohan-Peterson S., Bennett B., Culpepper J., Dang W., Zurawski G., de Vries J.E.: Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *Journal of Immunology* 1993; 151(11): 6370–6381.
- [143] de Waal Malefyt R., Figdor C.G., de Vries J.E.: Effects of interleukin 4 on monocyte functions: comparison to interleukin 13. *Research in Immunology* 1993; 144(8): 629–633.
- [144] Weinstock J.V., Boros D.L.: Modulation of granulomatous hypersensitivity. VI. T lymphocyte subsets influence mast cell density in liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Journal of Immunology* 1983; 131(2): 959–961.

- [145] Weinstock J.V., Elliott D.E.: Helminth Infections Decrease Host Susceptibility to Immune-Mediated Diseases. *Journal of Immunology* 2014; 193(7): 3239–3247.
- [146] Weiss S.T.: Eat dirt—the hygiene hypothesis and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347(12): 930–931.
- [147] Yamada H., Hirai K., Miyamasu M., Iikura M., Misaki Y., Shoji S., Takaishi T., Kasahara T., Morita Y., Ito K.: Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 231(2): 365–368.
- [148] Yazdanbakhsh M., Kremsner P.G., van Ree R.: Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 2002; 296(5567): 490–494.
- [149] Ying S., Robinson D.S., Meng Q., Barata L.T., McEuen A.R., Buckley M.G., Walls A.F., Askenase P.W., Kay A.B.: C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 163(7): 3976–3984.
- [150] Yu B., Wright S.D.: LPS-dependent interaction of Mac-2-binding protein with immobilized CD14. *Journal of Inflammation* 1995; 45(2): 115–125.
- [151] Zacccone P., Burton O.T., Gibbs S., Miller N., Jones F.M., Dunne D.W., Cooke A.: Immune Modulation by *Schistosoma mansoni* Antigens in NOD Mice: Effects on Both Innate and Adaptive Immune Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010: 1–12.
- [152] Zacccone P., Fehervari Z., Phillips J.M., Dunne D.W., Cooke A.: Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology* 2006; 28(10): 515–523.
- [153] Zheng X., Hu X., Zhou G., Lu Z., Qiu W., Bao J., Dai Y.: Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *Journal of Neuroimmunology* 2008; 194(1-2): 107–114.

Anhang A

Tabelle A.1: Aus Monozyten in der Kokultur freigesetztes, antiinflammatorisches IL-10; normalisiert auf die IL-10 Freisetzung LPS-stimulierter Monozyten

| Monozyten in Medium | Monozyten + LPS | Monozyten + LPS + Basophile | Monozyten + LPS + IL-4 | Monozyten + LPS + Basophile + <i>E. coli</i> -IPSE/alpha-1 |
|------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| n. d. | 100 | 106 | 80 | 67 |
| 1,49 | 100 | 117 | 15 | 47 |
| n. d. | 100 | 96 | 15 | 53 |
| n. d. | 100 | 249 | 21 | 100 |
| 2,22 | 100 | 138 | 32 | 127 |
| n. d. | 100 | 206 | 19 | 105 |
| n. d. | 100 | 104 | 46 | 116 |
| n. d. | 100 | 66 | 20 | 32 |
| n. d. | 100 | 137 | 50 | 133 |
| n. d. | 100 | 130 | 34 | 91 |
| n. d. | 100 | 81 | 34 | 46 |
| n. d. | 100 | 131 | 24 | 112 |
| n. d. | 100 | 145 | 40 | 133 |
| n. d. | 100 | 180 | 72 | 139 |

Anhang B

Tabelle B.1: Aus basophilen Granulozyten in der Kokultur freigesetztes IL-4 [pg/ml]

| Monozyten in Medium | Monozyten + LPS | Monozyten + LPS + Basophile | Monozyten + LPS + IL-4 | Monozyten + LPS + Basophile + <i>E. coli</i> -IPSE/alpha-1 |
|------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| n. d. | n. d. | 26 | n. d. | 113 |
| n. d. | n. d. | 10 | n. d. | 75 |
| n. d. | n. d. | 6 | n. d. | 78 |
| n. d. | n. d. | 8 | n. d. | 101 |
| n. d. | n. d. | 9 | n. d. | 21 |
| n. d. | n. d. | 6 | n. d. | 34 |
| n. d. | n. d. | 8 | n. d. | 220 |
| n. d. | n. d. | 13 | n. d. | 84 |
| n. d. | n. d. | 6 | n. d. | 103 |
| n. d. | n. d. | 14 | n. d. | 74 |
| n. d. | n. d. | 14 | n. d. | 67 |
| n. d. | n. d. | 3 | n. d. | 44 |
| n. d. | n. d. | 13 | n. d. | 57 |
| n. d. | n. d. | 11 | n. d. | 91 |

Zusammenfassung

Wie epidemiologische Studien und Tierexperimente belegen, können Infektionen mit parasitären Würmern den Wirt vor der Entwicklung chronischer Entzündungen (u. a. Asthma, Allergien und Autoimmunerkrankungen) schützen. Verantwortlich dafür sind immunregulatorische Faktoren, welche von den Parasiten sezerniert werden. Bei Schistosomen ist das Ei-Stadium antiinflammatorisch wirksam. Die Eier von *S. mansoni*, welche in großer Zahl in den Mesenterialvenen des Wirts abgelegt werden, wandern, begünstigt durch entzündliche Prozesse, durch das Darmepithel in das Darmlumen. Im Zuge von Abwehrprozessen werden um die Schistosomen-Eier Granulome gebildet. Blutgefäße und die Darmwand werden direkt geschädigt. Intestinale Mikroorganismen dringen in das Gewebe ein. All dies führt zu lokalen Entzündungen. Hierbei scheinen die Interleukine IL-4 und IL-13 essentiell für die Kontrolle der Entzündung zu sein, da IL-4- und IL-4-Rezeptor- α -defiziente Mäuse bei einer Infektion mit *S. mansoni* rasch an einer exzessiven Entzündung ihres Darms versterben. *S. mansoni*-Eier sezernieren das Glykoprotein, IPSE/ α -1 (IL-4 induzierendes Prinzip aus *S. mansoni*-Eiern), welches Basophile zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 stimuliert. Diese Interleukine hemmen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus mit LPS aktivierten Monozyten und führen zur alternativen Aktivierung von Makrophagen. Somit stellte sich die Frage, ob IPSE/ α -1 über die Induktion von basophilem IL-4 an der Suppression einer überschießenden intestinalen Entzündung im Zuge einer Infektion mit *S. mansoni* beteiligt ist.

Um das antiinflammatorische Potential von IPSE/ α -1 genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Dissertation LPS-stimulierte humane Monozyten bzw. PBMC mit IPSE/ α -1-aktivierten Basophilen kokultiviert. In den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA pro- und antiinflammatorische Zytokine bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf Monozyten durchflusszytometrisch analysiert. IPSE/ α -1-aktivierte humane Basophile hemmten *in vitro* die Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF) aus LPS-aktivierten Monozyten – auch im Kontext mit PBMC. Dieser Effekt wurde durch basophiles IL-4 vermittelt und erfolgte zellkontaktunabhängig. Dabei führte die gleichzeitige Stimulation der Basophilen über Fc ϵ RI-gebundenes IgE (via IPSE/ α -1) und über TLR4 (via LPS) – entsprechend dem höchst inflammatorischen Umfeld *in vivo*, gekennzeichnet durch Granulombildung, Schädigung des intestinalen Gewebes und Eindringen von Mikroorganismen – zu einer synergistisch erhöhten Freisetzung von IL-4 und IL-13. Die Freisetzung des entzündungshemmenden IL-10 war hingegen nicht signifikant beeinflusst. Ferner entwickelten die inflammatorischen Monozyten in Gegenwart der aktivierten Basophilen einen M2-typischen antiinflammatorischen Phänotyp mit erhöhter Oberflächenexpression von CD206

und CD209. Mittels immunhistologischer Untersuchungen an Geweben (Leber und Darm) *S. mansoni*-infizierter Mäuse konnten zudem Basophile in den Ei-Granulomen nachgewiesen werden, womit von den Schistosomen-Eiern sezerniertes IPSE/alpha-1 unmittelbar auf die Basophilen wirken könnte.

Insgesamt unterstützen diese Daten die Hypothese, dass IPSE/alpha-1 und Basophile zusammen mit LPS substantiell an der durch *S. mansoni*-Eier vermittelten intestinalen Entzündungskontrolle beteiligt sein könnten.

Abstract

As shown by epidemiological and animal studies, infections with parasitic worms may protect the host against the development of chronic inflammations such as asthma, allergy and autoimmune disorders. This is due to immunoregulatory molecules secreted by the parasites. In schistosomes, it is the egg stage which exhibits anti-inflammatory capacities. *S. mansoni* eggs, which are deposited in high numbers in the host's mesenteric vasculature, migrate through the intestinal epithelium to the gut lumen promoted by inflammatory events such as granuloma formation, tissue destruction and invasion of intestinal microbiota. In these events, interleukin-4 (IL-4) and 13 seem to be essential for inflammation control since *S. mansoni*-infected mice deficient in IL-4 or IL-4 receptor α die early from excessive intestinal inflammation. *S. mansoni* eggs secrete the glycoprotein IPSE/ α -1 (IL-4 inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs), which triggers basophils to release IL-4 and IL-13. These interleukins have been shown to inhibit pro-inflammatory cytokine release from LPS-activated monocytes and induce alternatively activated macrophages. Therefore the question arose if IPSE/ α -1, via the induction of basophil IL-4, is involved in the suppression of excessive intestinal inflammation during *S. mansoni* infection.

To study the anti-inflammatory capability of IPSE/ α -1, LPS-activated human monocytes as well as PBMC were co-cultured with IPSE/ α -1-activated basophils. Culture supernatants were analyzed for the presence of pro- and anti-inflammatory cytokines by ELISA. In addition, the expression of characteristic surface markers on monocytes was examined by flow cytometry. *In vitro* IPSE/ α -1-activated basophils inhibited the release of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β and TNF) from LPS-activated monocytes and PBMC, respectively. This effect proved to depend on IL-4 released by basophils and to be independent of cell-cell-contact. Moreover, simultaneous stimulation of basophils via Fc ϵ RI-bound IgE (with IPSE/ α -1) and TLR4 (with LPS) – corresponding to the highly inflammatory conditions *in vivo* with granuloma formation, intestinal tissue destruction and invading microbiota – boosted the release of IL-4 and IL-13 from basophils. In contrast, there was no significant difference in the release of anti-inflammatory IL-10. Furthermore, in presence of activated basophils pro-inflammatory monocytes developed an anti-inflammatory M2-like phenotype with increased surface expression of CD206 and CD209. In addition immunohistological staining of liver and gut sections of *S. mansoni* infected mice confirmed the presence of basophils in the egg granuloma allowing IPSE/ α -1 secreted by schistosome eggs to interact directly with basophils.

These findings suggest that IPSE/ α -1 and basophils along with LPS may play an important role in intestinal inflammation control mediated by *S. mansoni* eggs.

Danksagung

An erster Stelle bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Gabriele Schramm, die als Mentorin diese Arbeit betreut hat. Nicht zuletzt haben die vielen von ihr eingeräumten Freiheiten und zahlreichen lenkenden Hinweise im Laufe meiner Arbeit zu deren Gelingen beigetragen. Zudem danke ich Herrn PD Dr. Helmut Haas. Ihm, als ehemaligen Leiter der Forschungsgruppe Zelluläre Allergologie am FZB, habe ich zu verdanken, dass ich überhaupt in Borstel arbeiten konnte. Danke auch für die vielen Diskussionen während meiner ersten Zeit in Borstel und Deine kritische Sicht auf die Dinge. Desweiteren danken möchte ich Herrn PD Dr. Norbert Reiling, der als zweiter Mitberater mit seinem Blick von außen für einige Denkanstöße sorgte.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Heine sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder bedanke ich mich für die Erstellung der Gutachten, welche mir die Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ermöglichen.

Der gesamten (ehemaligen) Forschungsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders dankbar bin ich Frau Heike Rohweder, Frau Daniela Dalock (geb. Barths), Frau Claudia Trümper und Frau Sandra Nyenhuis für ihre exzellente technische Unterstützung bei allen Laborarbeiten. Ebenso möchte ich mich bei Frau Kristina Langhans für die vielen gemeinsamen und unterhaltsamen Stunden an der Sterilbank bedanken. Ich danke auch Frau Dr. Natalie Reimers, Herrn Dr. Arne Homann sowie Frau Beate Höschler für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre zahlreichen konstruktiven Fragen während der wöchentlichen Besprechungen. Ebenso bedanken möchte ich mich bei den Auszubildenden Carina, Jesper und Philipp für die vielen Stunden, die sie am Elutriator verbracht haben.

Vieles wäre ohne Unterstützung inner- und außerhalb des Forschungszentrums nicht möglich gewesen. Frau Carola Schneider danke ich für ihr stets offenes Ohr bei allen meinen Fragen und Wünschen zur Auswahl der Blutspender und darüber hinaus. Desweiteren danke ich Herrn Dr. Thomas Scholzen für seine Ausführungen zu und Unterstützung bei der Durchflusszytometrie sowie der Fluoreszenzmikroskopie, Frau Janine Braun für die Einarbeitung in die histologische Aufbereitung von Gewebeproben, Cindy Hass für ihre Einführung in die Chemotaxis-Analysen und Frau Dr. Zane Orinska für die Mastzellfärbung. Schließlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Mike J. Doenhoff (University of Nottingham, UK) für die Bereitstellung des Mausgewebes bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie – allen voran Sandra, die plötzlich wieder auftauchte und mich damit sehr glücklich machte, Gabi und Jürgen, die (fast) immer mittwochs und freitags auf dem Stand waren und mir ein Abschalten ermöglichten sowie Thorsten, der un-

ermüdlich Korrektur las und mir stets mit Rat zur Seite stand. Danke für die vielen schönen gemeinsam verbrachten Abende, Wochenenden und Urlaubstage.

Zu guter Letzt danke ich Hinnerk, Mama und Papa, Heidi und Hauke für jegliche Unterstützung, ihre Geduld, ihr Verständnis, ihren Rückhalt und ihre Liebe über all die Jahre.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht, auch nicht in Teilen, publiziert bzw. zur Publikation eingereicht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft eingehalten.

Flintbek, Dezember 2015

Katrin Knuhr